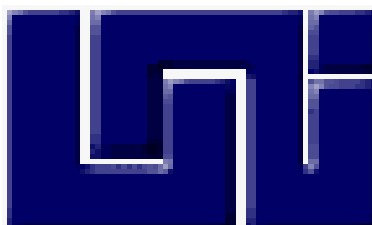


UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA
FACULTAD DE INGENIERIA QUÍMICA



**BIOPROSPECCIÓN MICROBIANA DIRIGIDA A IDENTIFICAR
MICROBIOLÓGICA Y MOLECULARMENTE MICROORGANISMOS DE UTILIDAD
AGRÍCOLA E INDUSTRIAL EN NICARAGUA**

TRABAJO DE DIPLOMA PRESENTADO POR:

Br. Heysell Dodanig Delgado Silva

Br. Erick Junior Fonseca Cruz

PARA OPTAR AL TÍTULO DE:

INGENIERO QUÍMICO

TUTOR:

Ph.D. Leandro Alberto Páramo Aguilera

Managua, Nicaragua

Octubre 2019

AGRADECIMIENTO

Agradezco infinitamente a Dios por brindarme la sabiduría y el conocimiento para finalizar con éxito este propósito y por darme la oportunidad de seguir construyendo los fundamentos de mi formación profesional.

Al mismo tiempo agradezco a mi familia, en especial a mis queridos padres, Eduviges Marina Silva Montiel y Jorge Alejandro Delgado González por ser una guía y apoyo en todas las etapas de mi vida que me condujeron a obtener tal distinción.

A nuestro tutor Ph. D Leandro Alberto Páramo Aguilera por su apoyo incondicional, humano, intelectual, gestiones efectuadas en pro del desarrollo de este trabajo monográfico y por su reconocimiento a mi esfuerzo.

A mi compañero de tesis Br. Erick Fonseca Cruz porque juntos logramos concretar esta jornada investigativa, como resultado de nuestro trabajo en equipo.

También a mis compañeros del Laboratorio de Operaciones y Procesos Unitarias del Programa de Investigación, Estudios Nacionales y Servicios del Ambiente (PIENSA) de la Universidad Nacional de Ingeniería (UNI), en especial a la Tec. Hazel Alexandra Aragón por hacer de este trabajo una experiencia muy agradable.

A una persona incondicional, Hansell Bladimir Martínez Rosales por su apoyo, consejos oportunos y motivación durante el desarrollo del trabajo monográfico.

Heysell Dodanig Delgado Silva



AGRADECIMIENTO

A Dios por permitirme la vida y los recursos necesarios para concluir con éxito esta etapa de mi formación profesional.

A nuestro tutor, Ph. D Leandro Alberto Páramo Aguilera, por la confianza que depositó en nosotros, por compartirnos su tiempo y conocimientos y por su anuente y fundamental tutoría para la realización de este trabajo monográfico.

A la profesora, M. en I. María Albertina Reyes Conrado; revisora del protocolo monográfico, por su valiosa intervención en el mejoramiento de aspectos metodológicos y científico-técnicos para cumplir con los objetivos propuestos en la investigación.

Deseo expresar mi agradecimiento a mi compañera de tesis, Br. Heysell Dodanig Delgado Silva, sobre el ejercicio analítico y de discusión siempre constructiva que hemos desempeñado a lo largo de nuestro trabajo en equipo.

A la Vice-Rectoría de Investigación y Desarrollo (VRID), por ser el organismo financiador de la investigación, con el proyecto nacional de Bioprospección Microbiana.

Al Programa de Investigación, Estudios Nacionales y Servicios del Ambiente (PIENSA), por prestar las instalaciones de sus laboratorios para el desarrollo analítico de esta investigación, en especial al personal del Laboratorio de Microbiología de Aguas y del Laboratorio de Operaciones y Procesos Unitarias, por aportarnos sus conocimientos a través, de la interpretación de las diferentes técnicas aplicadas en cada etapa del proceso.

A los propietarios de cada uno de los sitios de muestreo; establecimientos artesanales dedicados a la producción de derivados lácteos y oro respectivamente, por haber permitido el acceso de nuestro equipo de trabajo a sus instalaciones, para aislar el material microbiológico, la materia prima elemental de la investigación.

Erick Fonseca Cruz



DEDICATORIA

Principalmente a Dios que es todo amor.

A las personas que estuvieron siempre para darme su apoyo incondicional y a quienes me motivaron directa e indirectamente a la realización de esta meta profesional tan significativa en mi vida.

A aquellas personas que día a día se esfuerzan para alcanzar sus metas de formación profesional.

*“Todo esfuerzo tiene su recompensa
sigue demostrando tu perseverancia
y llegaras a la meta,
que nada te detenga”*

Recuerda...

*“La paciencia todo lo alcanza,
quien a Dios tiene nada le falta”.*

Heysell Dodanig Delgado Silva



DEDICATORIA

A Dios dador de vida y creador de todas las cosas.

Cada tarea desafiante necesita de esfuerzo propio, así como de la orientación de mentores, especialmente de aquellos que están más cerca de nuestros corazones.

Este esfuerzo se lo dedico de manera sincera y especial,

A mis padres;

Erick Fonseca López y Mirania Cruz Zapata,

por haberme sabido querer y educar, por ser los pilares fundamentales de mi formación humana y académica, cuyas palabras de motivación y confianza han influido siempre en el alcance de mis ideales, por lo que hoy soy capaz de conseguir tal éxito y honor.

A mi profesora;

Lic. Jacqueline López Ríos,

con quien tuve el honor de iniciarme en el mundo del saber y construir de su mano una formación integral en mi vida. Su enseñanza fue, es y será parte de esta etapa que culmina y que quedará guardada en los recuerdos de mi vida.

Erick Fonseca Cruz



RESUMEN

Los microorganismos se encuentran presentes en todos los ambientes y son capaces de sintetizar productos útiles para el hombre. Representan unos pocos centenares de especies de entre las más de cien mil descritas en la naturaleza. El proceso de bioprospección microbiana hace referencia a la búsqueda, conocimiento y selección de la microbiota específica de un hábitat con uso actual y potencial, a la purificación del material microbiológico aislado y finalmente a la identificación completa de las especies microbianas que a mediano o a largo plazo producen generosos beneficios. Por consiguiente, surgió la iniciativa de desarrollar este proyecto con el propósito de buscar cepas nativas potencialmente útiles para el desarrollo ingenieril de procesos biotecnológicos con énfasis en la agricultura y la industria.

Esta investigación estuvo orientada a bioprospectar en dos ecosistemas artificiales: Quesera artesanal y Planteles mineros. Se aplicaron técnicas de aislamiento y purificación (siembra masiva, por inmersión, en estría y por punción), además se desarrolló un reconocimiento de las características morfológicas de todos los microorganismos mediante la tinción de Gram observada al microscopio con objetivo de 100x para bacterias, la observación de esporas con objetivo de 50x para hongos filamentosos y la observación de tinción simple con objetivo de 50x para levaduras. Así como pruebas moleculares (secuenciación de las regiones 16S para bacterias e ITS y D1/D2/D3 para hongos) de 50 aislados seleccionados según sus características morfológicas (40 bacterias, 4 hongos filamentosos, 6 hongos levaduriformes), con vistas a lograr su identificación final. Se realizó una revisión bibliográfica en bancos de datos internacionales para establecer las aplicaciones biotecnológicas y que estaban científicamente fundamentadas para las cepas identificadas.

Concluido el presente trabajo, habiéndose seleccionado 6 puntos de muestreo para la quesera artesanal y 7 puntos para los planteles mineros; se obtuvo un total de 163 aislados microbianos, que mediante las pruebas morfológicas mostraron ser 127 aislados bacterianos, 30 aislados de hongos filamentosos y 6 aislados de hongos levaduriformes. Es posible afirmar, que las pruebas microbiológicas desarrolladas contribuyen en conjunto con las herramientas moleculares a una identificación microbiana confiable.

La aplicación de las pruebas microbiológicas y las herramientas moleculares permitió identificar finalmente 15 especies bacterianas diferentes y 8 especies fúngicas distintas, además de las identificados hasta nivel de géneros bacterianos (*Pantoea* sp) y hongos tipo *Trichoderma* sp. Entre los identificados completamente podemos citar los siguientes: bacterias como *Acinetobacter calcoaceticus* (1), *Aeromonas hydrophila* (1), *Bacillus cereus* (4), *Bacillus marisflavi* (1), *Enterobacter cloacae* (2), *Escherichia coli* (1), *Exiguobacterium aurantiacum* (1), *Klebsiella pneumoniae* (1), *Planococcus maritimus* (1), *Proteus penneri* (1), *Pseudomonas aeruginosa* (2), *Psychrobacter alimentarius* (1), *Serratia marcescens* (3), *Staphylococcus aureus* (1) y *Terribacillus saccharophilus* (1); hongos como *Cybelindnera jadinii* (2), *Rhodotorula mucilaginosa* (1), *Candida pararugosa* (1), *Trichosporon asahii* (1), *Pichia jadinii* (1),



Penicillium janthinellum (1), *Penicillium simplicissimum* (1) y *Aspergillus hiratsukae* (1). Cabe destacar que los resultados de la identificación molecular en la mayoría de los casos, para bacterias confirman su identidad en un 99 % y para hongos confirman su identidad con un 100%.

En cuanto a las aplicaciones biotecnológicas para los microorganismos identificados en este trabajo permiten plantear para la agricultura: la biopromoción del crecimiento vegetal y bioprotección del estrés abiótico y biótico en diversos cultivos o en sus cosechas, mediante bacterias y hongos como: *Acinetobacter calcoaceticus*, *Aeromonas hydrophila*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Psychrobacter alimentarius*, *Serratia marcescens*, *Terribacillus saccharophilus*, *Penicillium janthinellum* y *Penicillium simplicissimum*, *Trichoderma sp*, *Cyberlindenera jadinii* y *Rhodotorula mucilaginosa*. Para la industria: producción de enzimas, biodegradación de colorantes usados en la industria (textil, cosmética y farmacéutica), biolixiviación y producción de aceite se han identificado microorganismos como: *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Bacillus sp*, *Penicillium janthinellum*, *Penicillium simplicissimum*, *Trichoderma sp*, *Rhodotorula mucilaginosa* y *Trichosporon asahii*.

Adicionalmente se obtuvo una serie de microorganismos identificados plenamente y que resultan valiosos para el desarrollo de bioprocesos aplicables al ambiente. Entre estos microorganismos podemos citar: *Bacillus cereus*, *Bacillus marisflavi*, *Planococcus maritimus*, *Bacillus sp*, *Acinetobacter sp* y *Cyberlindnera jadinii*, que son de gran utilidad en el manejo de sistemas contaminados con cromo hexavalente y otros metales pesados.

Finalmente, el desarrollo de este trabajo en bioprospección microbiana en la búsqueda de microorganismos útiles para el desarrollo de bioprocesos aplicables a la agricultura y la industria, aportó un buen número de microorganismos plenamente identificados y que han sido reportados en la literatura científica como útiles para el desarrollo de diversos bioprocesos. Lo anterior, abre las puertas para la adición de investigaciones que podrían contribuir por medio de la biotecnología a la mejora del agro y la industria nacional.



TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTO	I
DEDICATORIA	III
RESUMEN	V
I. INTRODUCCIÓN	12
II. OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo general.....	14
2.2 Objetivos específicos.....	14
III. MARCO TEÓRICO.....	15
3.1 Bioprospección	15
3.1.1 Bioprospección en Nicaragua.....	15
3.2 Microorganismos	16
3.2.1 Clasificación de los microorganismos.....	17
3.2.2 Principales microorganismos del ambiente	17
3.2.3 Requerimientos nutricionales de los microorganismos.....	20
3.2.4 Siembra de microorganismos	21
3.3 Identificación morfológica microbiana.....	22
3.3.1 Morfología macroscópica: estudio de la colonia	22
3.3.2 Morfología microscópica: estudio de la célula	24
3.4 Identificación molecular microbiana.....	27
3.4.1 Extracción de ADN	27
3.4.2 Amplificación de ADN.....	28
3.4.3 Secuenciación de ADN.....	28
3.4.4 Análisis bioinformático	29
3.5 Aplicaciones biotecnológicas de los microorganismos	30
3.5.1 Aplicaciones en la agricultura.....	31
3.5.2 Aplicaciones en la industria	33
IV. METODOLOGÍA.....	36
4.1 Ubicación del estudio.....	36
4.2 Descripción de los sitios de muestreo	36



4.2.1	Quesera artesanal para la producción de lácteos	37
4.2.2	Planteles mineros para la extracción de oro.....	37
4.3	Toma de muestras.....	38
4.3.1	Puntos de muestro en la quesera artesanal	39
4.3.2	Puntos de muestro en los planteles mineros	39
4.4	Aislamiento microbiano.....	40
4.4.1	Preparación de medios de cultivo.....	40
4.4.2	Inoculación de muestras.....	41
4.4.3	Selección y purificación de las colonias microbianas	43
4.5	Conservación de los microorganismos	44
4.6	Identificación microbiana	45
4.6.1	Pruebas morfológicas desarrolladas para la identificación microbiana.....	45
4.6.2	Identificación molecular	47
4.7	Búsqueda de aplicaciones agrícolas e industriales de los microorganismos identificados.....	49
VII.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	50
7.1	Bioprospección microbiana.....	50
7.1.1	Toma de muestras.....	50
7.1.2	Aislamiento y purificación de microorganismos	54
7.1.3	Pruebas morfológicas desarrolladas para la identificación microbiana.....	56
7.1.4	Identificación molecular de microorganismos seleccionados....	72
7.1.5	Aplicaciones biotecnológicas agrícolas e industriales de las cepas autóctonas identificadas	82
7.2	Publicaciones generadas de la investigación	97
VII.	CONCLUSIONES.....	98
VIII.	RECOMENDACIONES	100
IX.	BIBLIOGRAFÍA	101
X.	ANEXOS	120



LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la evolución del mundo vivo clasificado en el sistema de tres dominios.....	16
Figura 2. Diferentes morfologías macroscópicas de las colonias bacterianas.....	23
Figura 3. Tipos de morfologías y agrupaciones celulares bacterianas	24
Figura 4. Proceso de la técnica de tinción de Gram y la reacción de la pared de celular bacteriana	25
Figura 5. Estructuras de los conidióforos característicos de algunos géneros de hongos filamentosos	26
Figura 6. Diversas formas celulares de las levaduras observadas en el microscopio	26
Figura 7. Esquema del proceso de identificación microbiana por vía molecular.....	27
Figura 8. Vista panorámica del municipio La libertad-Chontales en la Región Central de Nicaragua.....	36
Figura 9. Sitios de muestreos	37
Figura 10. Sistema de muestreo aleatorio simple.....	38
Figura 11. Preparación de medios de cultivo.....	40
Figura 12. Técnica de aislamiento por siembra masiva en superficie.....	41
Figura 13. Procedimiento de diluciones seriadas de la muestra y técnica de siembra por inmersión	42
Figura 14. Técnica de siembra en estrías o diseminación	43
Figura 15. Aislamiento de hongos filamentosos mediante la técnica de siembra por punción	44
Figura 16. Procedimiento de la técnica de tinción de Gram en bacterias.	45
Figura 17. Técnica de cinta adhesiva para la observación de esporas en los hongos filamentosos.....	46
Figura 18. Procedimiento de la técnica de tinción simple para levaduras.....	46
Figura 19. Procedimiento para la corrección de errores en las secuencias.....	47
Figura 20. Fragmento del listado de las secuencias reportadas en Gen Bank del NCBI con las que muestra homología la secuencia problema	48
Figura 21. Ventana del programa BioEdit para el alineamiento de secuencias.....	49
Figura 22. Puntos de muestreo en la quesera artesanal	51
Figura 23. Puntos de muestreo en los planteles mineros	52
Figura 24. Fracción de las muestras aisladas.....	53
Figura 25. Representación de los cultivos axénicos.	55
Figura 26. Morfología macroscópica de las bacterias y su respectiva morfología microscópica en tinción de Gram.....	57
Figura 27. Morfología macroscópica de las bacterias y su respectiva morfología microscópica en tinción de Gram.....	58



Figura 28. Morfología macroscópica de las bacterias y su respectiva morfología microscópica en tinción de Gram	59
Figura 29. Morfología macroscópica de las bacterias y su respectiva morfología microscópica en tinción de Gram	60
Figura 30. Crecimiento de los hongos levaduriformes y la observación de sus células al microscopio	67
Figura 31. Crecimiento de los hongos filamentosos y la observación de sus esporas al microscopio	67
Figura 32. Fragmento del árbol de las relaciones evolutivas de las bacterias	73
Figura 33. Fragmento del árbol de las relaciones evolutivas de los hongos.....	79



LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Antibióticos relevantes producidos por agentes microbianos de control biológico	32
Tabla 2. Principales enzimas microbianas con aplicación industrial.	34
Tabla 3. Producción microbiana de ácidos orgánicos relevantes en la producción de nuevos materiales	35
Tabla 4. Resumen cuantitativo de los cultivos axénicos bacterianos y fúngicos aislados de los 6 puntos muestreados en la quesera artesanal	54
Tabla 5. Resumen cuantitativo de los cultivos axénicos bacterianos y fúngicos aislados de los 7 puntos muestreados en los planteles mineros.....	54
Tabla 6. Características morfológicas macroscópicas y microscópicas de las bacterias aisladas en la quesera artesanal.	61
Tabla 7. Características morfológicas macroscópicas y microscópicas de las bacterias aisladas en los planteles mineros.	63
Tabla 8. Características morfológicas macroscópicas y microscópicas de los hongos levaduriformes aislados en la quesera artesanal y los planteles mineros...68	
Tabla 9. Características morfológicas macroscópicas y microscópicas de los hongos filamentosos aislados en la quesera artesanal y los planteles mineros. ..	69
Tabla 10. Identificación molecular de 22 cepas de bacterias cultivables procedentes de la quesera artesanal.....	74
Tabla 11. Identificación molecular de 18 cepas de bacterias cultivables procedentes de los planteles mineros.....	76
Tabla 12. Identificación molecular de 10 cepas de hongos cultivables procedentes de la quesera artesanal y los planteles mineros.	80
Tabla 13. Aplicaciones biotecnológicas de utilidad agrícola e industrial de los aislados bacterianos identificados a nivel de especie, procedentes de la quesera artesanal y los planteles mineros.	83
Tabla 14. Aplicaciones biotecnológicas de utilidad agrícola e industrial de los aislados bacterianos identificados a nivel de género procedentes de la quesera artesanal y los planteles mineros.	87
Tabla 15. Aplicaciones biotecnológicas de utilidad agrícola e industrial de aislados de hongos filamentosos y levaduriformes identificados a nivel de especie y/o género, procedentes de la quesera artesanal y los planteles mineros.....	90



I. INTRODUCCIÓN

Las condiciones climatológicas y la posición geoestratégica única de Nicaragua la hacen acreedora de una exuberante micro y macro biodiversidad que representa el 7% de la diversidad biológica del mundo según el Ministerio del Ambiente y de los Recursos Naturales (MARENA, 2014). La diversidad de los recursos biológicos del país le confiere ventajas para la exploración y el desarrollo del inmenso campo de la biotecnología; esto es posible, mediante una actividad científica conocida como bioprospección, considerada un campo auxiliar de la biotecnología (Piñero, 2013). Cabe destacar que la bioprospección relacionada a la biodiversidad se entiende como la búsqueda sistemática de genes, componentes naturales y organismos completos en la naturaleza, buscando darles un potencial para el desarrollo de productos. También es útil para saber cómo manejar de manera óptima los recursos que ya se conocen y cómo darles nuevos usos, sin agotarlos. Involucra tres etapas o ejes: investigar, transformar en producto y comercializar (Huete-Pérez, 2008).

En esta coyuntura, actualmente Nicaragua cuenta con importantes investigaciones y desarrollo en el campo de la biotecnología dirigidos a la búsqueda de microorganismos con aplicaciones útiles en diversos sectores de la agricultura y la industria, las cuales se realizan en distintos centros de educación superior e instituciones públicas y privadas, entre ellos se destacan: la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua-León (UNAN-León), Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua-Managua (UNAN-Managua), Universidad Centroamericana (UCA), Universidad Nacional Agraria (UNA), Universidad Nacional de Ingeniería (UNI), Universidad Politécnica de Nicaragua (UPOLI), Centro Nacional de Investigación Agropecuaria y Biotecnología (CNIAB) e Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria (INTA) (González, 2011). Sin embargo, son pocos los registros de investigaciones de bioprospección que estudian la microbiota o las capacidades potenciales de los microorganismos presentes en la gran variedad de ecosistemas con los que cuenta el país, a continuación, se presentan los únicos registros encontrados:

- Gómez y Huete (2008), a través de su investigación buscaron nuevas enzimas de restricción (ER) en bacterias de suelos en ambientes aún inexplorados, como zonas volcánicas y agrícolas del país. Aquí reportaron la identificación de isoesquizómeros de 14 ER conocidas: *Bam*HI, *Eco*RV, *Mbo*I, *Mae*I, *Hae*III, *Ea*rI, *Bso*BI, *Bsa*BI, *Acl* I, *Bsa*WI, *Nci* I, *Bst*NI, *Bss*SI y *Hpa*II, las 8 últimas termoestables.
- Méndez *et al.* (2017), en esta investigación se llevó a cabo el aislamiento e identificación de bacterias a partir de bioinsumos producidos artesanalmente en Nicaragua y se evaluó *in vitro* su antagonismo frente a hongos fitopatógenos de interés agrícola. Se realizó la caracterización morfológica de 14 aislados bacterianos y su respectiva secuenciación del gen ADNr 16S; posteriormente se evaluó el potencial antagónico mediante confrontación dual frente a los hongos identificados como *Fusarium equiseti*, *Fusarium sp* y *Alternaria alternata*.

Para desarrollar la biotecnología en el país, se requiere preferiblemente del trabajo conjunto de los sectores académicos, empresarial nacional o internacional, comunitario y gubernamental para establecer claramente qué se quiere hacer y para dónde se va (Malgarejo, 2003). Además, el país requiere de una valoración global sobre los beneficios que la micro biodiversidad aporta a los diferentes sectores de la industria; entre los que se destacan, los aportes que brinda a la industria farmacéutica, cosmetológica y química, a los servicios ambientales para la descontaminación de aguas y suelos, a la producción de oxígeno, a la fertilidad de los suelos, a la agricultura, entre otros (MARENA, 2014).

No es posible plantear el desarrollo de biotecnologías aplicadas a los sectores anteriormente mencionados sin estudios orientados a la bioprospección de especies autóctonas, que son las que tienen la capacidad de adaptarse al medio del cual son extraídas y que indudablemente son más eficientes en tales aplicaciones que cualquiera que pueda encontrarse comercialmente. A pesar de las diversas dificultades como la falta de una masa crítica mínima, carencia de inversión y poco involucramiento del sector productivo local, el presente trabajo estuvo orientado a bioprospectar una gama de microorganismos, entre bacterias, hongos filamentosos y levaduriformes como componentes microbiológicos de diferentes ecosistemas artificiales, con la finalidad de encontrar cepas nativas potencialmente útiles para el desarrollo ingenieril de procesos biotecnológicos con énfasis en la agricultura y la industria. El proceso consistió en aislar y purificar los microorganismos, diferenciar sus características fenotípicas y genotípicas a través de pruebas microbiológicas básicas y la aplicación herramientas moleculares, para su debida identificación a nivel de género o especie. Finalmente con la identificación de los microorganismos, se pretende sugerir sus posibles aplicaciones biotecnológicas, que puedan ser utilizadas en posteriores investigaciones en el campo de la biotecnología.

A partir de los microorganismos nativos identificados con diferentes utilidades y del banco de aislados con posible potencial biotecnológico, este proyecto pretende marcar un precedente que de alguna manera de continuidad a los pequeños emprendimientos que se realizan en el ámbito biotecnológico del país, por ejemplo: al contar con un aislado de una bacteria productora de ácido láctico, se puede pensar en desarrollar un proceso de producción masiva de esa bacteria mediante fermentaciones y aplicarla en un proceso tan común como la producción de yogurt u otros derivados de la industria láctica. Por otra parte, si se dispone de cepas de *Bacillus* tipo *subtilis* o *kokuria* u otros, se pueden desarrollar procesos útiles en la agricultura, en la industria enzimática, en el tratamiento de residuales o en la biorremediación de suelos. Además, diferentes tipos de hongos aislados pueden ser aplicados para prevenir daños a las cosechas.

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Identificar microbiológica y molecularmente microorganismos aislados de ecosistemas artificiales inducidos por las actividades humanas, que generan presión sobre la biodiversidad, para proponer sus aplicaciones en el desarrollo ingenieril de procesos biotecnológicos con énfasis en la agricultura y la industria.

2.2 Objetivos específicos

- Aplicar técnicas de aislamiento de microorganismos en una quesera artesanal y dos planteles mineros para la posterior purificación de la gama microbiológica cultivable.
- Caracterizar los cultivos microbianos axénicos, a través de pruebas morfológicas básicas (fenotípicas) y mediante la aplicación de herramientas moleculares (genotípicas).
- Establecer de acuerdo con la literatura las aplicaciones biotecnológicas de utilidad agrícola e industrial de las cepas autóctonas identificadas.

III. MARCO TEÓRICO

3.1 Bioprospección

La Bioprospección se define como un trabajo colectivo orientado a la búsqueda, conocimiento y selección de organismos o productos derivados, con uso actual o potencial en salud, alimentación, agroindustria y medio ambiente, entre otros y su aprovechamiento sostenible en procesos productivos a escala industrial o artesanal, con aplicación nacional o internacional de los productos o servicios generados (Melgarejo, 2003). En definitiva, la estrategia de la bioprospección implica tanto la conservación de la biodiversidad a bioprospectar, como de las especies y el material bioprospectado. Un proceso de bioprospección no es un punto de conclusión, sino de partida para el desarrollo de otras investigaciones y es parte integral de ellas.

3.1.1 Bioprospección en Nicaragua

Las condiciones actuales relacionadas a la conservación y uso sostenible de los recursos biológicos, así como al empleo de los beneficios obtenidos a partir de ellos en bien de la sociedad son un reto por enfrentar, debido a que el país no cuenta con un sistema nacional que desarrolle la prospección de la biodiversidad con el fin de explotar sus exuberantes ecosistemas para generar productos patentables y lucrativos para las industrias farmacéuticas y biotecnológicas. Se sabe que existen universidades que desarrollan líneas de investigaciones básicas y por lo tanto son pocas veces aplicadas. Además, en toda la nación se encuentran laboratorios privados que se dedican a la colecta de especies silvestres y/o domésticas para su utilización inmediata o para darles un valor agregado; pero, lo cierto es que no existen registros legales que muestren con certeza el uso que se le da a esa diversidad genética, a pesar de que es evidente que se utiliza intensivamente.

Se puede decir que las actividades de bioprospección científica, es decir, aquellas en las que participan científicos nacionales y algunas veces extranjeros, solo son registradas en el centro de trabajo o en la institución que impulso la gira de bioprospección y pocas veces la información se difunde para conocerse. Además, de que tales investigaciones no tienen como objetivo la obtención de ganancias de tipo económico; precisamente, la prospección en el país ha estado enfocada principalmente en el conocimiento y conservación del germoplasma, por cuanto, ha sido una investigación para determinar la diversidad genética existente y sus formas de vida para conservarla. Por tal razón, es necesario proponer acciones y líneas de trabajo en función de conocer y explotar los compuestos activos de estos recursos genéticos, así como de resolver los agudos problemas que atraviesa la población (MARENA, 2001).

3.2 Microorganismos

Los microorganismos constituyen un grupo de seres vivos sumamente heterogéneo cuya única característica común es su reducido tamaño; todos son lo suficientemente pequeños como para pasar inadvertidos al ojo humano, siendo preciso el uso de dispositivos de aumento como el microscopio óptico o en algunos casos el microscopio electrónico para poder observarlos. Pero gracias a las diversas técnicas innovadoras en las investigaciones microbiológicas, como el uso de las técnicas de secuenciación del ácido desoxirribonucleico (ADN) y el estudio del ARN de los ribosomas, los microorganismos se han agrupado desde el punto de vista evolutivo en tres grupos principales: Archeobacterias, Eubacterias y Eucariotas (Frioni, 2005). La **Figura 1** muestra un esquema de la evolución del mundo vivo basado en la estructura del ARN de los ribosomas.

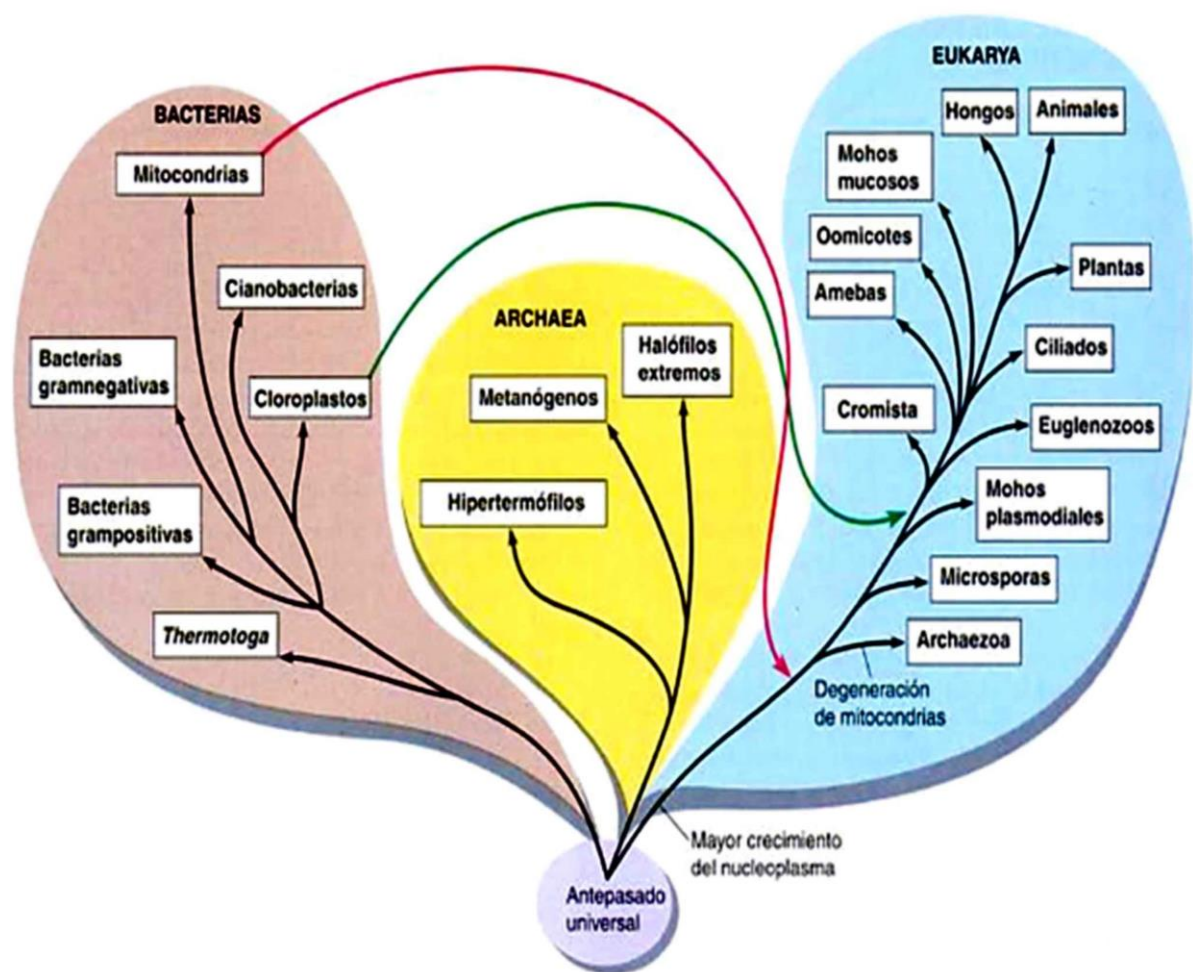


Figura 1. Esquema de la evolución del mundo vivo clasificado en el sistema de tres dominios: Archaea, Bacterias y Eukarya, basada en la estructura del ARN de los ribosomas propuesto por Carl R. Woese en 1978 (Tortora *et al.*, 2007).

3.2.1 Clasificación de los microorganismos

La ciencia que se ocupa de la clasificación de distintas formas de vida, se denomina taxonomía cuyo objetivo es establecer las relaciones entre un grupo de organismos y otros y diferenciarlos. Las nuevas técnicas desarrolladas en biología y genética molecular, permiten obtener conocimientos nuevos en clasificación y evolución (Rosselló, 2005). Dicho lo anterior es posible clasificar los microorganismos partiendo de su relación evolutiva, características fenotípicas, propiedades bioquímicas, requerimientos físicos, composición del ADN, grado de riesgo y hábitat.

Los microorganismos se clasifican en cuatro grupos: Archaea (presenta pared celular, pero carecen de peptidoglucano), Bacterias (las paredes celulares contienen un complejo de proteína-hidrato de carbono denominado peptidoglucano), Eukarya (incluye protistas: mohos mucosos, protozoos y algas y hongos: levaduras unicelulares, mohos multicelulares y setas) y Parásitos (virus); cada uno de estos grupos posee aspectos diferentes en cuanto a su relación, estructura, morfología, nutrición y reproducción (Vargas y Villazante, 2014).

3.2.2 Principales microorganismos del ambiente

En el ambiente los microorganismos se encuentran distribuidos en todos sus componentes; suelo, agua e incluso en el aire suspendidos en granos de polvo y partículas de agua, por lo tanto, también están presentes en las plantas, animales y en los alimentos cumpliendo funciones que en determinadas circunstancias pueden ser benéficas o perjudiciales para el ser humano.

Microorganismos del suelo

El componente microbiano del suelo es importante para la salud de los ecosistemas. A pesar de su aparente hostilidad, el suelo es el hábitat de innumerables seres vivos, donde se pueden encontrar una enorme cantidad de microorganismos diferentes, de tamaño y funciones muy variables que son fundamentales para el desarrollo de la vida en el planeta, jugando un papel relevante en la formación y estructuración del suelo y en la movilización de nutrientes.

Bacterias

Las bacterias son uno de los grupos clave en la transformación de la materia mineral y orgánica del suelo que contribuye a su fertilidad, entre los géneros comunes están: *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Chromobacterium*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Flavimonas*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Serratia* y *Xanthomonas* (Sierra et al., 2012; Moreno y Galvis, 2013; Schoebitz, 2006).

Hongos

En el suelo se han encontrado géneros y especies de hongos que lo dominan. Arias y Piñeros (2008), aislaron hongos del suelo, con mayor frecuencia los de géneros *Aspergillus sp* y *Penicillium sp* y menor proporción *Alternaria sp*, *Byssoschlamys sp*, *Cladosporium sp*, *Curvularia sp*, *Fusarium sp*, *Emericella sp*, *Eupenicillium sp*, *Mucor sp*, *Rhizopus sp*, *Sterigmatocytis sp* y *Trichoderma sp*. Según Samaniego y Chew (2007), los géneros de hongos que se desatanca en suelos agrícolas son *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Doratomyces*, *Drechslera*, *Fusarium*, *Gilmaniella*, *Mortierella*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizoctonia*, *Rhizopus*, *Scopulariopsis*, *Torula* y *Trichoderma*. Según Toro et al. (2005), los géneros de levaduras más frecuentes en suelo asociados con *Bulnesia retama* y *Larrea divaricata* son: *Candida*, *Debaryomyces*, *Dekkera*, *Saccharomyces*, *Torulaspora*, *Sporidiobolus* y *Pichia*.

Microorganismos del agua

Teniendo en cuenta la clasificación de las bacterias según la respuesta de su pared celular a la tinción de Gram, se mencionan algunas de las más frecuentes encontradas en el agua. Bacterias Gram negativas: se han aislado de aguas las pertenecientes a los géneros *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Brevundimonas*, *Bordetella*, *Chryseobacterium*, *Enterobacteriaceae*, *Flavobacterium*, *Gallionella*, *Leifsonia*, *Moraxella*, *Neisseria*, *Photobacterium*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Stenotrophomonas*, *Vagococcus* y *Vibrio*. Bacterias Gram positivas: no representan un grupo muy difundido en agua, sin embargo incluye algunos patógenos humanos aislados especialmente de aguas subterráneas. Los cocos más comunes pertenecen a los géneros *Micrococcus*, *Staphylococcus* y *Streptococcus* (Apella y Araujo, 2005; de la Rosa et al., 2016).

Microorganismos del aire

La atmósfera no tiene una microbiota autóctona, pero es un medio para la dispersión rápida y global de muchos tipos de microorganismos (bacterias, esporas, hongos y virus) procedentes de otros ambientes, el transporte se realiza sobre partículas de polvo, fragmentos de hojas secas, piel, fibras de la ropa, en gotas de agua o en gotas de saliva eliminadas al toser, estornudar o hablar. Algunos han creado adaptaciones especializadas que favorecen su supervivencia y permanencia. Frecuentemente del aire se aíslan bacterias esporuladas de los géneros: *Actinomicetos*, *Bacillus* y *Clostridium*, entre las bacterias también son muy frecuentes los bacilos pleomórficos Gram positivos (*Corynebacterium*) y los cocos Gram positivos (*Micrococcus* y *Staphylococcus*). Los bacilos Gram negativos (*Alcaligenes* y *Flavobacterium*) se encuentran en menor proporción y disminuyen con la altura. El género *Cladosporium* es el hongo que predomina en el aire, tanto sobre la tierra como sobre el mar, aunque también es frecuente encontrar otros mohos, como *Alternaria*, *Aspergillus*, *Mucor* y *Penicillium* y la levadura *Rhodotorula* (de la Rosa et al., 2002).

Microorganismos de la leche

Todas las transformaciones que experimentan la leche y sus derivados, ya sean deseables o indeseables, son el resultado de la acción de microorganismos presentes en ella, ya que por ser una materia orgánica rica en nutrientes representa un medio de vida para un amplio número de microorganismos exigentes en nutrientes.

Bacterias Gram positivas

- *Bacterias lácticas*: son aquellas que fermentan la lactosa dando una proporción elevada de ácido láctico en los productos de degradación.
- *Micrococos*: forman parte de la flora inocua que contamina la leche.
- *Estafilococos*: son aerobios facultativos, que provocan una fermentación acidificante de la glucosa. Este género comprende tres grupos, el más importante es el *Staphylococcus pyogenes*, también los *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus albus*.
- *Bacterias esporuladas (Bacillaceae)*: estas bacterias son las únicas que forman endospora, que tiene la importante propiedad de resistir temperaturas elevadas, en la leche se encuentran dos géneros; *Bacillus* y *Clostridium*.

Bacterias Gram negativas

- *Enterobacterias*: la mayor parte de ellas se encuentran en el intestino de los mamíferos, su presencia en la leche puede atribuirse a una contaminación de origen fecal. Fermentan la lactosa y forman gas carbónico (CO₂) y ácido. Entre las cuales se encuentran: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus* y *Serratia*, también pueden hallarse especies patógenas temibles como *Salmonella* y *Shigella*.
- *Achromobacteriaceae*: son aerobias, no fermentan la lactosa, no coagulan la leche. Se han definido tres géneros: *Achromobacter*, *Alcaligenes* y *Flavobacterium*.

Bacterias Gram diversas

- *Brucella* y *Pseudomona*.

Hongos filamentosos

- *Geotrichum*: crecen en forma seca o viscosa sobre la superficie de la leche agria, queso o crema. Es sensible a la sal la cual retarda su desarrollo, la pasteurización lo destruye. El *geotrichum cándidum*, invade las cuajadas frescas, crece mejor a una temperatura cercana a 27°C.
- *Penicillium*: este es uno de los hongos más comunes. Tienen un color verdoso cuando crece sobre las superficies de los quesos. Interviene en el madurado de diversos tipos de quesos. Las especies más comunes en lechería son: *Penicillium roqueforti*, *Penicillium camemberti*, *Penicillium expansum* y *Penicillium notatum*.

- *Aspergillus*: Existen muchas especies de este género. El *Aspergillus glaucus* y *Aspergillus repens*, han sido los responsables del crecimiento de brotes superficiales en leche condensada azucarada.

Hongos levaduriformes

- *Torula lactosa* y *Torula cremoris*: producen gas y poco alcohol y son la causa de que la leche se presente espumosa.
- *Sacharomyces fragilis* y *Sacharomyces lactis*: fermenta la lactosa con producción de alcohol.
- *Pichia fermentans*: se presenta en el suero de la mantequilla.
- *Turoloopsis lactis condensis*: se presenta en la leche condensada y azucarada.
- *Turoloopsis sphaerica*: se presenta en la crema espumosa y en el suero de la leche (Alais, 1988; Castro et al., 2013).

3.2.3 Requerimientos nutricionales de los microorganismos

Como todos los organismos vivos, los microorganismos requieren ciertos nutrientes básicos y factores físicos para el mantenimiento de su vida, estas necesidades varían según el tipo de microorganismo y es necesario conocerlas para cultivarlos en el laboratorio. Las necesidades nutricionales básicas de los microorganismos pueden satisfacerse en el laboratorio mediante el uso de medios de cultivos artificiales, los cuales se encuentran disponibles en una gran variedad y en general aportan a los microorganismos una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, elementos no metálicos, elementos metálicos, vitaminas, agua y energía. Por otro lado, las necesidades físicas involucran factores como: temperatura, pH y gases, los cuales se encuentran en un rango óptimo específico para cada microorganismo; por lo tanto, la variación de estas condiciones puede acelerar o disminuir su crecimiento.

Medios de Cultivos

Los medios de cultivos son sustratos o soluciones de nutrientes que permiten el desarrollo de los microorganismos. En condiciones de laboratorio para realizar un cultivo, se debe sembrar sobre el medio de cultivo elegido el inóculo de los microorganismos que van a crecer y multiplicarse para dar colonias. Cuando se trabaja con microorganismos o con un microorganismo en particular, se deben satisfacer sus necesidades nutricionales con el objetivo de recuperarlo y hacerlo crecer adecuadamente, esto requiere de la preparación de medios de cultivo. De manera general los medios de cultivo pueden ser artificiales o químicamente definidos. La constitución habitual de los medios de cultivo está dada por elementos como el agar, extractos, peptonas, fluidos corporales, sistemas amortiguadores, indicadores de pH, agentes reductores y agentes selectivos; en consecuencia, los medios de cultivos pueden ser líquidos o sólidos en función de las características del medio y discontinuos y continuos en función de la disponibilidad de nutrientes (Rojas, 2011).

3.2.4 Siembra de microorganismos

Sembrar o inocular, es introducir artificialmente una porción de muestra (inóculo) en un medio adecuado, con el fin de iniciar un cultivo microbiano para su desarrollo y multiplicación. Una vez sembrado el inóculo el medio de cultivo, se incuba a una temperatura adecuada para su crecimiento. Los criterios fundamentales para efectuar correctamente la siembra exigen que se efectué asépticamente, la esterilización completa de los medios de cultivo y del instrumental a utilizar, que se realicen únicamente las manipulaciones indispensables y que se trabaje fuera de toda corriente de aire, de ser posible utilizando un mechero o bien un flujo laminar (Santambrosio y Ortega, 2009).

Existen diferentes técnicas de siembra de acuerdo al medio utilizado y los requerimientos del microorganismo a estudiar. Según Santambrosio y Ortega (2009) en medios sólidos se pueden mencionar las técnicas de siembra siguientes:

- Siembra por inmersión: se coloca el inóculo en una placa o caja de Petri y sobre el mismo se vierte el medio de cultivo previamente fundido. Este método se utiliza para microorganismos aerobios.
- Siembra en superficie: se vierte sobre una placa de Petri el medio de cultivo fundido, se deja solidificar, se coloca sobre la superficie el inóculo y con ayuda del asa Drigalsky se extiende hasta su absorción total por el medio de cultivo. Este tipo de siembra se recomienda para microorganismos aerobios estrictos.
- Siembra en estría: se vierte sobre una placa de Petri el medio de cultivo fundido y se deja solidificar. Esta técnica consiste en dibujar estrías perpendiculares sobre el medio solidificado y en los cuatro puntos cardinales de la placa de Petri lo más separado posible para identificar diferentes morfologías en los crecimientos de bacterias.

Además de las técnicas de siembra antes mencionadas existen las descritas por Rojas (2011):

- Siembra masiva: es un método para obtener un gran número de microorganismos (Incremento del inóculo) en la superficie del medio de cultivo. Se utiliza un hisopo, el cual pasa por toda la superficie del medio de la placa de Petri en distintas direcciones y finalmente por el borde, para que el crecimiento del microorganismo sea total en la superficie del medio de cultivo.
- Siembra por punción: utilizado generalmente para observar el crecimiento de hongos y así más adelante establecer su morfología; así como para la transferencia o subcultivo. Consiste en tomar parte del micelio con un asa micológica (asa recta) y por una punción suave en el centro de la placa de Petri, inocular el microorganismo a estudiar. Dependiendo del objetivo, pueden hacerse múltiples picaduras en el medio de cultivo (varios puntos de siembra).

3.3 Identificación morfológica microbiana

La identificación bacteriana se basa fundamentalmente en la comparación de las características fenotípicas de bacterias desconocidas con aquellas de cultivos tipo. La fiabilidad de la identificación está en proporción directa al número de características similares. En el proceso de identificación bacteriana tradicional se establecen tres niveles de procesamiento:

1. Es importante tener en cuenta todas las características fenotípicas cuando se inicia el proceso de identificación, pero en principio se seleccionan aquellas que se consideran pruebas primarias y que son rápidas y sencillas de realizar, como la morfología en la tinción de Gram.
2. El segundo nivel de identificación debe especificar el género al que pertenece el microorganismo. Tanto en este nivel como en el anterior, la hipótesis sobre la probable identidad de un microorganismo se apoya en las características del cultivo.
3. En definitiva, la conclusión debe hacerse a nivel de especie. El empleo de ciertas pruebas bioquímicas permite identificar con un alto grado de precisión la mayoría de las bacterias significativas (Fernández *et al.*, 2010).

La identificación de los hongos se basa en tres caracteres fundamentales:

1. El aspecto macroscópico de las colonias y su observación microscópica, que permite confirmar si se trata de hongos levaduriformes o filamentosos.
2. Las características bioquímicas, útiles para la identificación de las levaduras.
3. La morfología microscópica, que permite identificar los hongos filamentosos (Prats, 2005).

3.3.1 Morfología macroscópica: estudio de la colonia

La mayoría de las bacterias se multiplican rápidamente y son visibles como colonias cuando se siembran en medios de cultivo sólidos adecuados. Requieren una incubación de aproximadamente 24 h en una atmósfera que favorezca su desarrollo, a temperatura óptima.

Las colonias pueden caracterizarse macroscópicamente a como se ilustra en la **Figura 2**:

- Forma: circular (*Staphylococcus*), filamentosa o irregular (*Bacillus*).
- Borde: en sierra o dentados (*Yersinia pestis*), ondulado (característico de los bacilos largos como *Bacillus anthracis*) o lisos (*Escherichia coli*).
- Superficie: plana, convexa, mamelonada, umbilicada, entre otros.
- Comportamiento frente a la luz: brillante (*Streptococcus*) u opaca (*Staphylococcus*).
- Olor: pueden presentar olores particulares como el frutal de *Pseudomonas aeruginosa* o el putrefacto de los microorganismos anaerobios.
- Consistencia: lisa, mucoide, rugosa, entre otras (Vargas y Kuno, 2014).

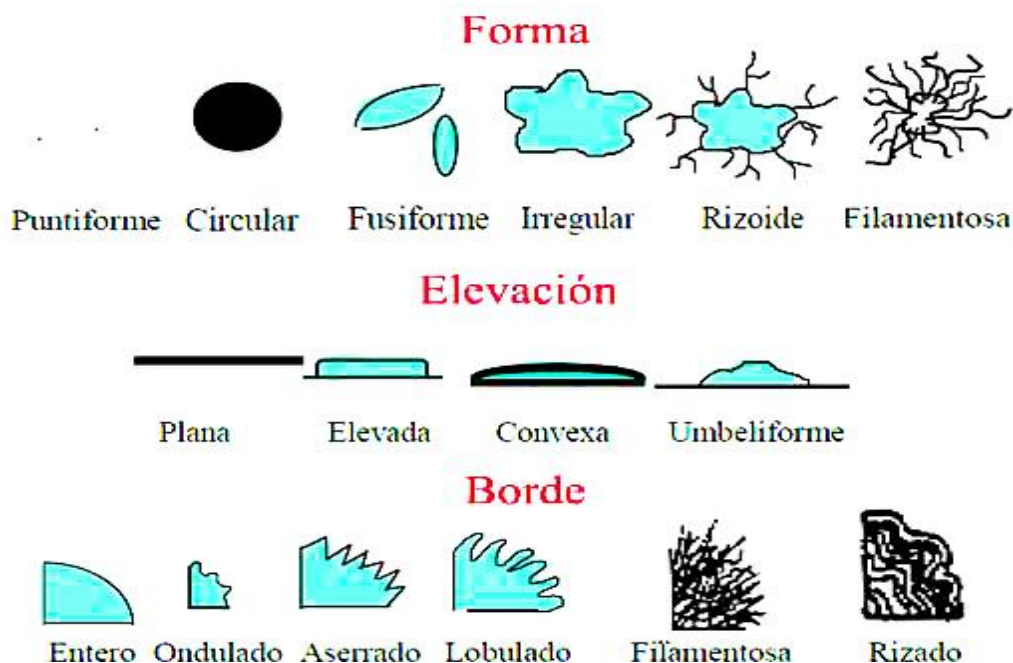


Figura 2. Diferentes morfologías macroscópicas de las colonias bacterianas, sembradas en medios sólidos (Fuente propia).

La identificación de los hongos filamentosos se inicia con la observación macroscópica de la colonia. Esta observación permite determinar las siguientes características:

- Aspecto de la colonia: algodonosa, aterciopelada, brillante, granulosa, lanosa, plumosa, polvosa y vellosa.
- Pigmentación de la colonia en anverso y reverso de la placa de Petri o pigmentación difusible en el medio: abarca una gama de colores (amarillo, azul, blanco, gris, negro, rojo, verde, etc.).
- Topografía de la colonia:
 - Forma: circular, filamentosa e irregular.
 - Elevación: elevada y limitada, plana y extendida y umbilicada.
 - Margen: desflecado, entero, lobulado y rizoide.
 - Superficie: cerebriforme, con surcos radiados y plegada.
 - Tamaño: crecimiento invasivo o crecimiento limitado.
- Producción de exudado.
- Consistencia: blanda, dura, elástica y mucoide (Mier *et al.*, 2002).

La observación macroscópica de las levaduras permite identificar algunas de sus características morfológicas. Las Levaduras dan lugar a colonias semejantes a las bacterias, suelen ser de color blanco crema, casi lisas (*Candida albicans*) o de aspecto seco y plegadas (*Candida krusei*), con algunas excepciones que forman micelio (*Geotrichum*, *Trichosporon*), las colonias mucoides sugieren la formación de cápsula (*Cryptococcus neoformans*). Las colonias de color rojo-naranja de aspecto cremoso o rugoso son propias de las especies del género *Rhodotorula* (Prats, 2005).

3.3.2 Morfología microscópica: estudio de la célula

Morfología microscópica bacteriana

Cuando se requiere conocer los detalles morfológicos de las bacterias es necesario recurrir a técnicas de coloración y observación al microscopio. Las bacterias al ser observadas al microscopio poseen diversas morfologías celulares que permite clasificarlas en los siguientes tipos (**Figura 3**):

- Cocos: células de forma redondeada. Estas bacterias pueden agruparse de dos en dos (diplococos), en cadenas (estreptococos), en forma de racimos (estafilococos), en forma de cubos (sarcina) o de cuatro en cuatro (tétradas).
- Bacilos: células con forma de bastón alargado. Algunas células adoptan una forma intermedia entre coco y bacilo, por lo que se denominan cocobacilos. Las bacterias con forma de bacilo también pueden agruparse formando filas de dos (diplobacilos) o filas más alargadas (estreptobacilos).
- Vibrios: células con forma de coma.
- Espirilos: células con forma de espiral.
- Espiroquetas: células de forma serpenteante (Vargas y Kuno, 2014).

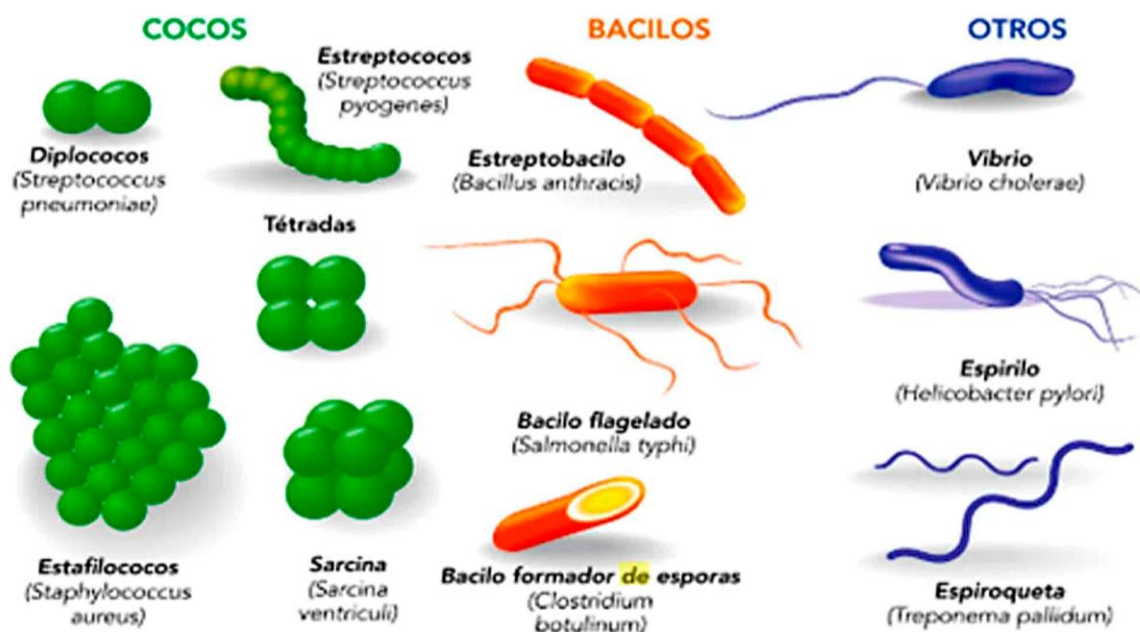


Figura 3. Tipos de morfologías y agrupaciones celulares bacterianas (Porres y Ruiz, 2018).

La coloración de Gram es la más usada en bacteriología, es una coloración diferencial, dado que las bacterias pueden clasificarse según su respuesta en Gram positivas o Gram negativas. Las primeras se tiñen de color azul violeta y las segundas adquieren un color rosado o rojo. La diferente reacción de las bacterias a la coloración de Gram se relaciona con diferencias fundamentales de la membrana celular de estas dos clases de células.

El procedimiento (**Figura 4**) se inicia con una tinción de las células bacterianas fijadas (frotis) mediante el colorante básico cristal violeta. Posteriormente se trata con una disolución de yodo, que a su vez forma un complejo con el cristal violeta insoluble en agua y sólo medianamente soluble en alcohol o acetona. Seguidamente las células se tratan con alcohol para diferenciarlas: las células Gram positivas retienen el complejo colorante-yodo, por lo que las vemos de color morado-azules; y las células Gram negativas son decoloradas por el alcohol, por lo que se hacen visibles mediante la coloración de contraste, en este caso la fucsina o safranina (López-Jácome *et al.*, 2014).

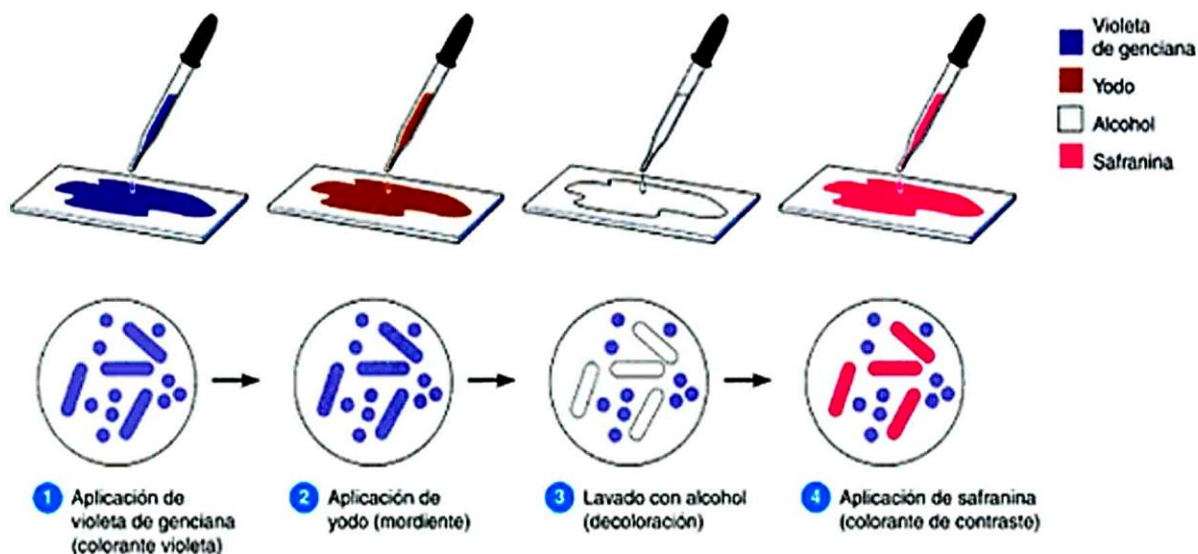


Figura 4. Proceso de la técnica de tinción de Gram y la reacción de la pared de celular bacteriana (Tortora *et al.*, 2007).

Morfología microscópica de hongos

La identificación de los hongos filamentosos se hace en base a las observaciones microscópicas de determinadas estructuras características del hongo; el aspecto de las colonias y fundamentalmente por la morfología microscópica del micelio, de las esporas y de las estructuras en las que se forman (conidióforos) (**Figura 5**), que suelen ser características del género o incluso de la especie. Para la observación microscópica de las colonias filamentosas, se toma un pequeño fragmento de la misma, cortando con el asa micológica o se recoge parte del micelio aéreo tocando la superficie de la colonia con la cara adhesiva de un fragmento de cinta adhesiva transparente que se transfiere a un portaobjetos. La técnica de la cinta adhesiva (celo) permite una mejor observación de la morfología y la disposición óptima de las estructuras de reproducción asexual, resultando el método de elección si se pretende la identificación de los hongos filamentosos (Prats, 2005).

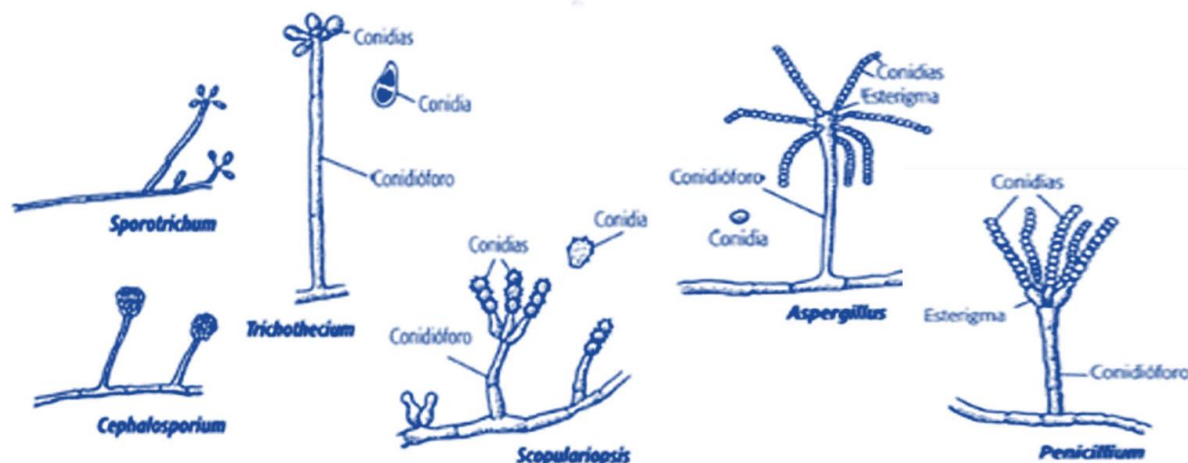


Figura 5. Estructuras de los conidióforos característicos de algunos géneros de hongos filamentosos (García, 2004).

Los hongos levaduriformes se identifican fundamentalmente mediante pruebas metabólicas, aunque determinados aspectos de su morfología microscópica son complementarios y se determinan por la observación microscópica. Las células de las levaduras son relativamente grandes (si se compara con una bacteria común), una levadura típica tiene forma ovoide pero también las hay alargadas, esféricas, de forma de pera o de limón o incluso triangulares (**Figura 6**). Cada especie tiene su forma característica, pero en un cultivo puro se puede observar que existen cierta variación en el tamaño y la forma de las células, variación que puede depender de la edad del cultivo y del medio donde se encuentren (García, 2004).

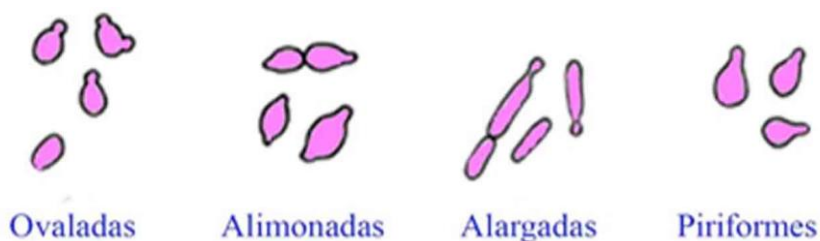


Figura 6. Diversas formas celulares de las levaduras observadas en el microscopio (García, 2004).

La estructura de una levadura es la de una típica célula eucariota. Al microscopio puede ser observada la pared celular, el citoplasma con vacuolas, glóbulos de grasas y gránulos metacromáticos. Las levaduras no poseen flagelos ni otro órgano de locomoción, pero algunas pueden presentar un material viscoso, compuesto de polisacáridos, que rodea la célula y que es semejante a la cápsula bacteriana (García, 2004). El examen microscópico de los cultivos se efectúa haciendo una suspensión de la colonia en una gota de solución salina o solución buffer depositada sobre un portaobjeto y observada en fresco, contrastándola con azul de lacto fenol u otros colorantes, también se puede fijar y teñir por la técnica de tinción de Gram (Prats, 2005).

3.4 Identificación molecular microbiana

Los métodos establecidos en biología molecular se consolidan con el uso de procedimientos y reactivos, los cuales detectan determinadas secuencias de ADN que son propias de un microorganismo. Los datos moleculares han permitido estudiar con precisión los patrones de diversidad genética y su distribución; la composición, funcionamiento y dinámica de comunidades microbianas; las relaciones filogenéticas, entre otros. La técnica de identificación molecular mediante el análisis del ARNr 16S u otros genes se basa en la amplificación genómica y secuenciación de esos genes o sus fragmentos (**Figura 7**). El medio de cultivo o las condiciones de incubación no son factores determinantes, pero si son factores críticos para la técnica de extracción del ADN y la amplificación. Los análisis moleculares de ADN implican desde la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés, Polymerase Chain Reaction) hasta el análisis bioinformático (Rodicio y Mendoza, 2004).



Figura 7. Esquema del proceso de identificación microbiana por vía molecular, mediante secuencias del ARNr (Fuente propia).

3.4.1 Extracción de ADN

La colecta de la muestra y su manejo adecuado son indispensables para una extracción exitosa de ADN. Una colecta y manejo apropiado de la muestra permite obtener ADN íntegro y sin contaminantes, los cuales afectan la acción de las enzimas durante la reacción de amplificación. El ADN genómico se extrae a partir de las células totales mediante diferentes métodos estándares o sistemas comerciales con versatilidad sobre el tipo de muestra o de matriz, en el caso de tratarse de una muestra alimentaria o ambiental. Dependiendo del tipo de microorganismo se pueden aplicar modificaciones que optimicen o simplifiquen la extracción cromosómica (Rodicio y Mendoza, 2004).

3.4.2 Amplificación de ADN

La PCR permite amplificar más de un millón de veces un ADN obtenido a partir de una región seleccionada del genoma, siempre y cuando se conozca una parte de su secuencia de nucleótidos. En un termociclador, el ADN se utiliza como molde para la amplificación por PCR de una secuencia del ARNr 16S con un rango de tamaño entre 500-1500 pb (o de otro tamaño si se analizan otros genes), con oligonucleótidos (primers por su nombre en inglés) de amplio espectro complementarios a las regiones conservadas, que amplificaría teóricamente el gen ARNr 16S en todas las bacterias.

Los oligonucleótidos actúan como cebadores para la síntesis *in vitro* del ADN, la cual está habitualmente catalizada por una enzima llamada *Taq polimerasa*. Dicha enzima se aísla de una bacteria termófila, denominada *Thermus aquaticus*, que es capaz de crecer a temperaturas elevadas (79-85°C). Ninguno de los oligonucleótidos o cebadores utilizados en la actualidad se considera totalmente universal, por lo que no se puede realizar una recomendación específica de cebadores que garanticen la amplificación de todos los procariotas (Acuña, 2015; Rodicio y Mendoza, 2004).

3.4.3 Secuenciación de ADN

La secuenciación del ARNr es el método de elección para determinar relaciones taxonómicas altas, debido a que la molécula de ARNr 16S contiene regiones altamente variables, es usualmente posible encontrar regiones de 20 a 30 bases que son completamente exclusivas de una sola especie de bacterias. La secuenciación es un proceso análogo a la PCR, que utiliza el ADN como molde para que los cebadores directo y reverso actúen en reacciones independientes. Estos cebadores pueden ser los mismos cebadores de amplificación u otros diseñados para esta etapa del ensayo. A diferencia de la PCR, no se genera un nuevo molde, sino que se reutiliza en los ciclos programados (25-35). Se añaden bases marcadas con fluorocromos o terminadores y bases no marcadas, que se irán incorporando aleatoriamente a la síntesis de la secuencia, por lo que al final se obtiene una mezcla de productos de ADN de diferentes tamaños. Cada base (Adenina, Timina, Guanina y Citosina) se marca con un fluorocromo diferente que absorbe a diferente longitud de onda, detectándose posteriormente.

Los términos no incorporados se eliminan mediante la purificación del producto y el tamaño de cada uno se determina mediante electroforesis capilar. Según se va conociendo el tamaño y el terminador de cada fragmento (separados en gel o por elución) se determina la secuencia de bases representadas cada una por un color diferente y se editan de forma manual o automática. Las cadenas de ADN se secuencian independientemente, generándose la secuencia directa y la reversa (complementaria). Según el modelo de secuenciador, el tipo de capilar utilizado y las variables en la secuenciación, es posible simplificar el proceso, reducir el tiempo de ensayo y el costo y aumentar el tamaño de la secuencia a analizar (500-900 bases) (Rodicio y Mendoza, 2004).

3.4.4 Análisis bioinformático

Con la rápida acumulación de datos moleculares proporcionados por los procedimientos de secuenciación, principalmente secuencias de proteínas o de ADN provenientes de diversos organismos, el estudio de la evolución a nivel molecular ha requerido el uso intensivo de los ordenadores que permiten el manejo de grandes cantidades de información. La bioinformática es una disciplina que se encuentra en la intersección entre las ciencias de la vida y de la información. Trata de desarrollar sistemas que sirvan para entender el flujo de información desde los genes a las estructuras moleculares, su función bioquímica, conducta biológica, etc. Si bien algunos restringen el rango de estudio de la bioinformática al manejo y análisis de bases de datos biológicas, principalmente de secuencias, podría atribuírsele en sentido más amplio, como la fusión de las técnicas computacionales con el entendimiento y apreciación de datos biológicos, el almacenamiento, recuperación, manipulación y correlación de datos procedentes de distintas fuentes (Acuña, 2015).

Análisis de secuencias

El análisis de la secuencia de ADN es el descubrimiento de similitudes funcionales y estructurales y las diferencias entre múltiples secuencias biológicas. Esto puede hacerse comparando las nuevas secuencias (desconocidas) con las bien estudiadas y anotadas (conocidas). Cabe destacar que este análisis incluye la alineación de secuencias, la búsqueda en la base de datos de secuencias, el descubrimiento de patrones, la reconstrucción de las relaciones evolutivas y la formación y comparación del genoma (Meneses *et al.*, 2011).

La comparación de las secuencias del gen ADNr 16S permite establecer relaciones filogenéticas entre organismos procariotas, de forma similar las regiones ITS y D1/D2/D3 permite hacer lo mismo en eucariotas. Esto ha traído una gran repercusión en la taxonomía microbiana, ya que ha dado lugar al sistema de clasificación actual que ha permitido la identificación rápida y precisa tanto de procariotas como de eucariotas. Las moléculas del ADNr 16S e ITS están presentes en todas las bacterias y en todos los eucariotas respectivamente, su análisis es por tanto, un instrumento de identificación universal, una de las características que las hace tan útil es que su estructura y función han permanecido sin mayores alteraciones durante un tiempo muy largo, de manera que cualquier cambio en la secuencia refleja sobre todo cambios aleatorios que ocurren de una forma suficientemente lenta, de modo que puede aportar información acerca de todos los procariotas a través de la escala evolutiva (Rodríguez, 2013; Rodicio y Mendoza, 2004).

Correlación filogenética

La filogenia es el estudio de las relaciones evolutivas. Un análisis filogenético indica las relaciones evolutivas entre las especies, cuales descienden de ancestros comunes y cuáles son las distancias entre ellas. Los métodos filogenéticos reconstruyen árboles en los que las ramas y los nodos unen a los diferentes taxones, que pueden ser especies, individuos, genes, etc. Al recorrer las ramas desde los nodos terminales hacia el nodo original, recorreremos la historia evolutiva de ese gen

u organismo (Acuña, 2015). Los árboles agrupan los organismos, de manera que todo lo que hay alrededor de un nodo es considerado un grupo monofilético, es decir, que todo el grupo se originan de un único ancestro común y por tanto pueden poseer rasgos comunes, cuando se presenta que un grupo excluye a algunos de sus descendientes se denomina parafilético (Baudalf, 2003).

Los árboles filogenéticos se pueden construir a partir de alineamientos múltiples de secuencias. En este caso se asume que cada posición en el alineamiento es homóloga; por lo tanto, construir un buen alineamiento es esencial para la resolución del árbol. La mayoría de los programas de alineamiento ofrecen una solución subóptima (la mejor posible utilizando pocos recursos del sistema), en consecuencia, resulta conveniente revisar los alineamientos antes de realizar los árboles. En general los problemas suelen acumularse en las regiones más variables en las que hay muchas sustituciones o gaps, en estos casos se podrían estar incluyendo posiciones que no son homólogas de modo que se estaría introduciendo una información no correcta en el análisis; por consiguiente, la revisión de los alineamientos se ha realizado con programas desarrollados para tal fin. Para la construcción de árboles filogenéticos a partir de métodos taxonómicos basados en secuencias, solamente una secuencia es requerida para identificar el organismo en términos de su tipo filogenético (Acuña, 2015).

3.5 Aplicaciones biotecnológicas de los microorganismos

Los microorganismos se consideran clave para el funcionamiento de los sistemas biológicos y el mantenimiento de la vida, ya que participan en procesos metabólicos, ecológicos y biotecnológicos, los cuales permiten satisfacer la demanda de alimentos, medicamentos y resolver problemas ecológicos y de contaminación ambiental. En otras palabras, parte de la actividad biológica esencial que permite la vida depende de los microorganismos. Algunos de los servicios ecosistemáticos que proveen los microorganismos son los siguientes:

- Descomposición y mineralización de desechos orgánicos (materia orgánica).
- Regulación de los ciclos biogeoquímicos (nitrógeno, fósforo, azufre, etc.).
- Retención y liberación de nutrientes para las plantas.
- Generación, mantenimiento y renovación del suelo y su fertilidad; recuperación de vegetación en ecosistemas degradados.
- Regulación atmosférica de gases traza (producción y consumo de CO₂, N₂O, N₂, etc.).
- Regulación de las poblaciones de animales y plantas.
- Control de plagas agrícolas y urbanas.
- Síntesis de productos farmacéuticos, alimenticios, industriales y de control biológico.
- Mantenimiento de la productividad primaria de agroecosistemas y ecosistemas (Montaño, 2010).

El aprovechamiento científico de los microorganismos se menciona en la biotecnología la cual se define como un área multidisciplinaria que puede ser aplicada en diferentes ámbitos. El desarrollo de procesos científicos y tecnológicos sobre la estructura y transformaciones de los materiales biológicos han puesto de actualidad esta área, no solo por los nuevos productos o transformaciones, sino también por la aplicación de estos conocimientos a procesos tradicionales (Rendueles y Díaz, 2014).

La biotecnología verde es aquella aplicada a la agricultura, ejemplo de ello es el diseño de plantas transgénicas capaces de crecer en condiciones ambientales desfavorables, plantas resistentes a plagas, a enfermedades, cultivos mejorados y el desarrollo de usos no alimentarios de los cultivos, como la producción de biocombustibles, en todos estos procesos participan también los microorganismos. La biotecnología blanca o industrial es la producción sustentable de químicos, materiales y combustibles a partir de fuentes renovables, usando células vivas o sus enzimas como catalizadores industriales y se define como un campo multidisciplinario que abarca las ciencias de la vida, de la química y de la ingeniería. Los procesos que utilizan biotecnología blanca cubren ya el 5 % de los procesos químicos en todo el mundo, siendo los sectores de la química fina y de la química básica los que presentan mayor avance en la transición de los procesos tradicionales a los procesos con biotecnología (Oliart *et al*, 2016).

3.5.1 Aplicaciones en la agricultura

La producción agrícola actual requiere de estrategias que reduzcan los insumos de agua, fertilizantes y fitosanitarios, para asegurar el rendimiento vegetal a un costo relativamente bajo, sin deterioro de la fertilidad del suelo. Las bacterias actualmente son aplicadas como inoculantes microbianos para potenciar los fenómenos de control biológico, o bien favorecer los procesos de biofertilización y fitoestimulación.

Biopesticidas

Para superar los peligros asociados al uso de plaguicidas químicos, se está adoptando cada vez más el uso de productos derivados de fuentes naturales, de origen vegetal o microbiano. En la **Tabla 1** se enumeran algunas de las sustancias antifúngicas y antibacterianas producidas por cepas bacterianas consideradas agentes de control biológico, y la enfermedad vegetal frente a la cual son efectivas.

Tabla 1. Antibióticos relevantes producidos por agentes microbianos de control biológico.

Antibiótico	Cepa	Patógeno	Enfermedad
2,4-diacetil-floroglucinol	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pythium spp.</i>	Marchitamiento fúngico
Agrocina 84	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Tumores
Bacilomicina, fengicina	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	Marchitez
Xantobacina A	<i>Lisobacter sp</i>	<i>Aphanomyces cochlioides</i>	Marchitamiento fúngico
Gliotoxina	<i>Trichoderma virens</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	Pudrición de la raíz
Herbicolina	<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>Erwinia amylovora</i>	Fuego bacteriano
Iturina A	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Botrytis cinerea</i> <i>Rhizoctonia solani</i>	Marchitamiento fúngico
Micosubtilina	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Pythium aphanidermatum</i>	Marchitamiento fúngico
Fenacinas	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Gaeumannomyces graminis var. tritici</i>	Enfermedad del pie, pudrición de la raíz
Pirrolnitrina, pseudano	<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Rhizoctonia solani</i> <i>Pyricularia oryzae</i>	Marchitamiento fúngico, quemazon
Zwittermicina A	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Phytophthora medicaginis</i>	Marchitamiento fúngico

Fuente: López et al. (2018)

Bioestimulantes y biofertilizantes

Los bioestimulantes vegetales contienen sustancias y/o microorganismos cuya función en las plantas o la rizosfera es estimular los procesos naturales para mejorar la absorción de nutrientes, la tolerancia al estrés abiótico y la calidad del cultivo. Los mecanismos utilizados por este tipo de bioproductos son muy diversos, y van desde mejorar la eficiencia del metabolismo vegetal para inducir aumentos en el rendimiento y en la calidad del cultivo, a aumentar la tolerancia de la planta a los distintos estreses bióticos y abióticos, pasando por facilitar la asimilación, translocación y uso de nutrientes, mejorar los atributos de calidad de los productos, como el contenido de azúcar, color o textura, hacer que el uso del agua sea más eficiente o mejorar ciertas propiedades fisicoquímicas del suelo o fomentar el desarrollo de los microorganismos rizosféricos.

Se acepta que los biofertilizantes son mezclas complejas de origen biológico, como abonos o compost, obtenidos de transformaciones principalmente aeróbicas de la materia orgánica a partir de residuos vegetales. Debido a su origen, los biofertilizantes contienen niveles suficientes de nutrientes vegetales (nitrógeno, fósforo, potasio, calcio y magnesio) y microorganismos que son capaces de producir el enriquecimiento en nutrientes del suelo, mejorando su disponibilidad para los cultivos.

3.5.2 Aplicaciones en la industria

Este apartado se centra en tres tipos de productos que presentan un amplio número de aplicaciones: las enzimas microbianas como elementos catalizadores de diversos procesos, los ácidos orgánicos y biopolímeros por su aplicación emergente en química verde y en producción de nuevos materiales, y la producción de bioenergía y biocombustibles, que contribuirá a la demanda energética renovable actual.

Enzimas microbianas

Entre las enzimas actualmente comercializadas, el 50 % son producidas por hongos y el 35% por bacterias. El número de enzimas microbianas descritas asciende a unas cuatro mil y los microorganismos productores son muy diversos, destacando por volumen actual de producción la bacteria *Bacillus subtilis* y el hongo *Aspergillus oryzae*. Alrededor de ciento cincuenta procesos industriales emplean enzimas microbianas y unos quinientos productos industriales se fabrican mediante su uso, siendo la industria de procesado de alimentos y bebidas el principal campo de aplicación actual, en la **Tabla 2** se muestran las principales enzimas empleadas por el sector industrial.

Biocompuestos y biopolímeros: nuevos materiales

Actualmente, los ácidos orgánicos más importantes en cuanto a volumen de producción son los ácidos acético, láctico, itacónico, succínico y cítrico. Los microorganismos y sus enzimas, se han constituido como elementos claves en la producción de estos compuestos y de otros que permiten la creación de nuevos procesos de síntesis. En la **Tabla 3** se muestran las alternativas biotecnológicas para la producción de los ácidos orgánicos con mayor potencial, así como sus principales aplicaciones.

Bioenergía y biocombustibles

El biocombustible microbiano de mayor proyección es el bioetanol, pero a él se unen otros biocombustibles líquidos como el butanol y el 2,3 butanodiol. Adicionalmente otros productos microbianos tales como el metano, el hidrógeno o el biohitano (mezcla de metano e hidrógeno) constituyen fuentes notables de bioenergía. Finalmente, los microorganismos capaces de transferir electrones extracelularmente se incorporan en los sistemas denominados células microbianas de combustible (MFC, por sus siglas en inglés) que permiten la producción directa de electricidad (bioelectrogénesis) (López *et al.*, 2018).

Tabla 2. Principales enzimas microbianas con aplicación industrial.

Enzima	Microorganismo productor	Aplicación
Amilasa	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Rhizopus</i>	• Germinación de cereales en cervecería • Producción de jarabe de maíz y glucosa • Tratamiento de frutas y zumos para eliminar el almidón de la pectina • Preparación de productos de panadería • Modificación del almidón para recubrimiento de papel
Proteasa	<i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus spp.</i> , <i>Aspergillus spp.</i>	• Tratamiento de la cerveza • Hidrólisis de la proteína de la leche • Preparación de leche evaporada • Preparación del cuero
Glucosa oxidasa	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Penicillium spp.</i>	• Eliminación de oxígeno en alimentos • Fabricación de dentífricos
Pectinasas	<i>Aspergillus niger</i>	• Clarificación, filtración y condensación de frutas y zumos • Prensado, clarificación y filtrado del vino • Producción de leche sin lactosa, concentrados lácteos y helados
Celulasa	<i>Clostridium</i> , <i>Cellulomonas</i> , <i>Thermomonospora</i> , <i>Trichoderma</i> ,	• Desteñido de papeles para reciclado • Desteñido de prendas vaqueras • Preparación de detergentes
Lipasa	<i>Rhizopus spp.</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Geotrichum</i> ,	• Limpieza de lentes de contacto • Detergentes desengrasantes • Maduración del queso
Fitasa	<i>Aspergillus spp.</i>	• Liberación de fosfato para alimentación animal
Hemicelulasas	<i>Trichoderma</i> , <i>Penicillium</i> <i>Aspergillus</i>	• Preparación de concentrados de café • Hidrólisis de la celulosa de biomasa para producir glucosa (bioetanol)
Catalasa	<i>Aspergillus spp.</i>	• Biolimpieza en la industria textil

Fuente: López et al. (2018)

Tabla 3. Producción microbiana de ácidos orgánicos relevantes en la producción de nuevos materiales.

Compuesto	Producción biotecnológica	Aplicaciones		
		Industria	Propiedades	Producto
Ácido acético	Producción de vinagre con <i>Acetobacter</i> o <i>Gluconobacter</i> (oxidación incompleta del etanol a acetato)	Alimentaria	Acidulante y preservativo	Aditivo alimentario (E260)
		Química y materiales	Síntesis de Acetato de polivinilo (PVAC)	Pinturas y barnices
			Síntesis de Acetato de celulosa	Filtros de cigarros, films y otros productos plásticos
Ácido láctico	Fermentación de carbohidratos (glucosa y otros) por <i>Lactobacillus</i> o <i>Saccharomyces</i> (modificado genéticamente)	Alimentaria, cosmética, farmacéutica	Regulador del pH, agente antimicrobiano, saborizante, humectante y agente para limpieza	Múltiples
		Química y materiales	Síntesis de polímeros: Ácido poliláctico (PLA)	Plástico biodegradable sustituto de plásticos convencionales
Ácido succínico	Fermentación de glucosa por <i>Escherichia coli</i> recombinante, <i>Basfia succiniciproducens</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i> recombinante	Industria alimentaria	Aditivo y suplemento alimentario, regulador de la acidez y saborizante	Aditivo alimentario (E 363)
		Química y materiales	Síntesis de polímeros (resinas) y uso directo	Resinas, plastificantes, flexibilizantes y solventes de pinturas
Ácido itacónico	Cultivo de <i>Aspergillus terreus</i> o <i>Aspergillus itaconicus</i> en glucosa o melazas	Química y materiales	Síntesis de polímeros	Polímeros súper absorbentes, resinas, plásticos, fibras sintéticas. Potencial reemplazo de Metacrilato
Ácido adípico	<i>Escherichia coli</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Química y materiales	Síntesis de polímeros	Nylon

Fuente: López et al., (2018)

IV. METODOLOGÍA

4.1 Ubicación del estudio

La aplicación de las técnicas de aislamiento, purificación e identificación microbiana para la búsqueda de microorganismos útiles en la agricultura y la industria a partir de ecosistemas artificiales, se realizaron en las instalaciones del Laboratorio de microbiología de aguas del Programa de Investigación Estudios Nacionales y Servicios del Ambiente (PIENSA) de la Universidad Nacional de Ingeniería (UNI), ubicado en el Recinto Universitario Simón Bolívar, Intersección Pista Juan Pablo II y Avenida Universitaria, Managua, Nicaragua. Los microorganismos seleccionados para la identificación fueron enviados al Centro de biología molecular de la Universidad Centroamericana (UCA) y al Laboratorio de biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua-Managua (UNAN-Managua) donde se contrataron los servicios de extracción de ADN genómico. Luego fueron enviados a la Compañía Macrogen, ubicada en Seoul, en la República de Corea del Sur para su respectiva secuenciación. Una vez recibidas las secuencias el proceso de identificación se extendió a las actividades de bioinformática en el PIENSA-UNI.

4.2 Descripción de los sitios de muestreo

En el municipio La Libertad (**Figura 8**), ubicado en el departamento de Chontales, jurisdicción de la Región Central del país, se hizo un reconocimiento de la zona para determinar los sitios de muestreo. Según el Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria (INTA, 2013) el municipio presenta condiciones medioambientales favorables para la producción, hecho que le confiere ser un territorio donde se desarrollan diversas actividades económicas como la ganadería, agricultura, minería, etc., y además, el albergue de un inestimable número de especies microbianas que precisan de esas condiciones de vida para su subsistencia.



Figura 8. Vista panorámica del municipio La libertad-Chontales en la Región Central de Nicaragua (Fuente propia).

4.2.1 Quesera artesanal para la producción de lácteos

En La Libertad el procesamiento de la leche de ganado bovino se hace de manera artesanal; el Sr. Pedro Lazo ganadero y productor de derivados lácteos en el municipio, asegura que los mismos ganaderos y productores se asocian en cooperativas para formar centros de acopio de leche y procesarla artesanalmente. En la primera jornada de muestreo se dispuso de una quesera artesanal (**Figura 9 A**) que procesaba diariamente 200 L de leche, lo que se traduce en un volumen de producción aproximado de 30 kg de queso fresco y 12 L de crema. La leche (materia prima) era fresca recién salida del ordeño y almacenada en canoas plásticas, para luego pasar a la operación de descremado, donde se obtiene la crema y como subproducto leche descremada, que posteriormente es mezclada con una igual cantidad de leche fresca, sal y coágulo. Una vez efectiva la coagulación enzimática, el queso es trasladado a un recipiente metálico que tiene la función similar a la de un filtro prensa, transcurridas 18 h de filtración se producen los 30 kg de queso fresco y como subproducto lactosuero salado y un remanente de lactosuero simple fermentado, los cuales son trasegados desde el área de filtrado hasta una pila de aguas residuales a través de un canal que yace en el piso de concreto de la quesera.

4.2.2 Planteles mineros para la extracción de oro

Todos los planteles mineros para la extracción de oro en La Libertad, están asociadas al organismo conocido como COOPEMILICH (Cooperativa de pequeños mineros de La Libertad-Chontales), que regula la distribución de la materia prima para dicho proceso; según el Sr. Juan Carlos Chavarría presidente de la cooperativa y propietario de uno de los planteles, la pequeña minería tiene derecho a explotar el 1% de las concesiones aprobadas a las industrias mineras. En este muestreo se exploraron dos planteles mineros con un alcance particular de producción de 12 g de oro promedio por cada tonelada de broza procesada. La broza es la materia prima de este proceso que llega desde la beta (mina) hasta los plateles en grandes tamaños (rocas), por lo cual es fragmentada en pequeños pedazos con un cincel de forma manual, para ser finalmente molida en las rastras (**Figura 9 B**).



Figura 9. Sitios de muestreos. A. Descremado de la leche fresca en la quesera artesanal y B. Extracción de oro en los planteles mineros (Fuente propia).

El proceso inicia en las rastras; una tasa de concreto circular que es alimentada gradualmente por la broza y por un flujo constante de agua de pozo, el sistema de arrastre instalado en el centro de la tasa de concreto tritura la broza hasta formar un lodo que conforme la agitación del agua y la acción del azogue (Mercurio) hace que las partículas invisibles del mineral se precipiten, el lodo que se genera es trasegado hacia un dique de colas; un sistema de diez pilas de sedimentación, el cual recibe tratamiento semanal para mitigar la contaminación ambiental con Mercurio. Las colas o lamas son retirados periódicamente de las pilas y se depositan en el patio del plantel para su comercialización. Con el mismo principio de funcionamiento el segundo plantel minero lo conforman tres rastras; sin embargo, las aguas residuales del proceso son drenadas directamente al ambiente a través de un canal natural.

4.3 Toma de muestras

En cada sitio de muestreo, las condiciones desde la recolección hasta la culminación del experimento se deben considerar, debido a que la temperatura, la disponibilidad de oxígeno, la humedad y el almacenamiento afecta la microbiota y los bioprocesos que en ella intervienen. Por tanto, los procedimientos de muestreo tienen que asegurar que el número y las actividades de los microorganismos no se alteren, de manera no cuantificable durante la recolección y conservación de la muestra. También tienen que asegurar que las muestras son representativas y que no están contaminadas con microorganismos extraños; es decir, el procedimiento debe asegurar que los microorganismos solo proceden del ecosistema que se está examinado (Arias y Piñeros, 2008). Los muestreos se realizaron aplicando el sistema de muestreo aleatorio simple, que consiste en tomar una porción de la muestra de manera independiente con respecto al tiempo y espacio (Pacheco y Cabrera, 2011). Las muestras sólidas se tomaron con una pala metálica estéril (**Figura 10 A**) y las muestras líquidas con vasos de precipitado estériles (**Figura 10 B**), para evitar la contaminación cruzada. En el transporte de las muestras se utilizaron bolsas de cierre hermético de 100 mL y tubos cónicos estériles de 50 mL y se almacenaron en condiciones de refrigeración a 10°C en un termo portátil. En la toma de muestras se definieron los puntos de muestreo en fuentes específicas como agua, materia prima, suelo, materia orgánica, etc., que generan una amplia información sobre las distintas poblaciones microbianas que se están desarrollando en cada proceso.



Figura 10. Sistema de muestreo aleatorio simple. A. Toma de muestra sólida en los planteles mineros y B. Toma de muestra líquida en la quesera artesanal (Fuente propia).

4.3.1 Puntos de muestro en la quesera artesanal

La exploración en la quesera artesanal permitió definir 6 puntos de muestreo, 5 muestras en estado líquido y 1 en estado sólido.

- Muestra I (leche fresca): materia prima para la producción de derivados lácteos.
- Muestra II (leche descremada): primer subproducto del proceso obtenido posterior al descremado.
- Muestra III (lactosuero salado): subproducto obtenido en la operación de filtrado.
- Muestra IV (lactosuero simple fermentado): remanente que se genera como subproducto de la coagulación enzimática simple.
- Muestra V (sedimentos de drenaje): materia orgánica adherida al canal que trasiega las aguas residuales.
- Muestra VI (aguas residuales): desechos líquidos y sólidos que se generan durante todo el proceso.

4.3.2 Puntos de muestro en los planteles mineros

La exploración en los planteles mineros determinó 7 puntos de muestreo, de los cuales 3 corresponden a muestras líquidas y 4 a muestras sólidas. La enumeración de los puntos de muestreo se realizó de manera consecutiva, de modo que las muestras I, II, III y IV fueron tomadas en el primer plantel minero, por lo tanto, las muestras tomadas en el segundo plantel minero fueron las muestras V, VI y VII.

- Muestra I (lodo en dique de cola): lodos que se generan en las rastras (sistema de trituración por arrastre), constituido por el mineral molido.
- Muestra II (aguas residuales): efluente que proviene del último dique.
- Muestra III (cola o lama fresca): colas o lamas recién apiladas.
- Muestra IV (cola o lama vieja): colas o lamas apiladas en el patio del plantel por mucho tiempo.
- Muestra V (aguas residuales estancadas): desechos líquidos y sólidos estancados en una fosa natural.
- Muestra VI (sedimentos de drenaje): materia orgánica adherida a un cauce natural que trasiega las aguas residuales al ambiente.
- Muestra VII (suelo de colas): muestra tomada a 0.1 m por debajo de la superficie de una cola que se acumuló como producto de la actividad minera.

4.4 Aislamiento microbiano

El aislamiento de los microorganismos se realizó en medios sólidos, a partir de las muestras individuales tomadas en cada sitio de muestreo. Para tal fin, se inoculó aplicando las técnicas de siembra masiva y por inmersión. Posteriormente se extendieron las técnicas de aislamiento a la purificación de las colonias microbianas obtenidas, mediante las técnicas de siembra en estría (agotamiento o diseminación) y la siembra por punción, la aplicación de estas técnicas fue necesario hasta garantizar la pureza de los cultivos aislados.

4.4.1 Preparación de medios de cultivo

La preparación de medios de cultivo es una técnica empleada en microbiología para el cultivo y la manipulación de los microorganismos en condiciones de esterilidad. Los medios de cultivo se prepararon según las especificaciones del fabricante.

- Agar Nutritivo (AN): se agregaron 23 g de Agar Nutritivo en 1 L de agua destilada.
- Agar Luria-Bertani (LB): se agregaron 40 g de Agar Luria-Bertani en 1 L de agua destilada.
- Agar Plate Count (PCA): se agregaron 23.5 g de Agar Plate Count en 1 L de agua destilada.
- Agar Papa Dextrosa (PDA): se agregaron 39 g de Agar Papa Dextrosa en 1 L de agua destilada.
- Agar Milk (AM): se agregaron 22 g de Agar Milk en 1 L de agua destilada.

Los medios de cultivo se sometieron a calentamiento hasta hervir en el Hot Plate CORNING Mod. PC-620D. Posteriormente se procedió a esterilizar por calor húmedo en el Autoclave LLAMATO Mod. SQ810C durante 15 minutos a 121°C y una presión de 100Kpa. Finalmente se vertieron en placas de Petri dejándolos solidificar a la temperatura del laboratorio (28°C ± 2) (**Figura 11**) (Solano, 2006).



Figura 11. Preparación de medios de cultivo. A. Medios de cultivo LB y AM en sus envases, B. Calentamiento a 500°C y agitación a 31.42 rad/s del medio de cultivo en el Hot Plate, C. Dispensación del medio de cultivo en tubos de ensayo y D. Placa de Petri con el medio de cultivo solidificado (Fuente propia).

4.4.2 Inoculación de muestras

Una vez que se tomaron las muestras, se incubaron en los cinco medios de cultivo referidos en la sección anterior (6.4.1). La inoculación se realizó por duplicado en placas de Petri desechables con Agar Nutritivo (AN), Agar Luria-Bertani (LB), Plate Count Agar (PCA), Agar Potato Dextrosa (PDA) y Agar Milk (AM). En los medios AN, LB y PCA se pretendía observar el crecimiento bacteriano, mientras que en el medio PDA el crecimiento de hongos tanto filamentosos como levaduriformes y en el medio AM el crecimiento de bacterias ácido-lácticas a partir de las muestras tomadas en la quesera artesanal.

Siembra masiva en superficie

Las actividades de aislamiento se iniciaron en campo con la técnica de siembra masiva en superficie siguiendo el procedimiento descrito por Rojas (2011). Inicialmente se realizaron hisopados de las muestras por duplicado sobre la superficie de la placa en todas direcciones y finalmente por el borde. Las placas inoculadas se trasladaron bajo condiciones de refrigeración a 10°C y en la incubadora MEMMERT No. serie: 377010, fueron puestas en incubación el mismo día en el laboratorio durante 24 horas a 35°C, una temperatura óptima para el crecimiento de un amplio número de microorganismos mesófilos. Diariamente se revisaron las placas en función del crecimiento que se observó y del tipo de microorganismos que pudiesen identificarse desde el punto de vista morfológico (**Figura 12**).



Figura 12. Técnica de aislamiento por siembra masiva en superficie. A. Hisopados de las muestras en distintas direcciones, B. Incubación de las muestras inoculadas en placas de Petri a 35°C y C. Placa de Petri con cultivo mixto después de 5 días de incubación (Fuente propia).

Siembra por inmersión o vertido en placa

Esta técnica de aislamiento se aplicó en el laboratorio para favorecer el crecimiento separado de las colonias microbianas en las placas de cultivo realizando diluciones de las muestras enteras después de 24 h en refrigeración a 10°C. Por consiguiente, se pretendía obtener un estimado de la población viable cultivable en los diferentes medios de cultivo, de modo que fuera más fácil aislar los microorganismos. Se hicieron diluciones seriadas de las muestras en solución buffer desde la dilución 10^{-1} hasta la dilución 10^{-6} , para luego realizar las correspondientes inoculaciones.

Inicialmente se prepararon las muestras madres, para las muestras sólidas se tomó una porción de 5 g de la muestra y se mezcló con 5 mL de agua destilada estéril y para las muestras líquidas se midieron 5 mL los cuales se colocaron en un tubo de ensayo. Posteriormente en cada una de las muestras madres se tomó 1mL y se mezcló en un tubo de ensayo con 9 mL de solución buffer. La dilución 10^{-2} se obtuvo mezclando 1mL de la dilución 10^{-1} con 9 mL de solución buffer. Este procedimiento se repitió hasta obtener una dilución 10^{-6} ; es decir, se realizaron seis diluciones seriadas a partir de la dilución 10^{-1} (**Figura 13 A**). Todas las muestras contenidas en sus respectivos tubos se agitaron en el Agitador Vortex SCIOLOGEX, Mod. MX-S hasta obtener una dilución 10^{-6} . Luego se inoculó en la placa de Petri 1mL de cada muestra diluida, se añadió el medio estéril a una temperatura no mayor de 45°C y se mezcló suavemente (**Figura 13 B**). Finalmente, todas las placas se incubaron a 35°C (Madigan *et al.*, 2006).

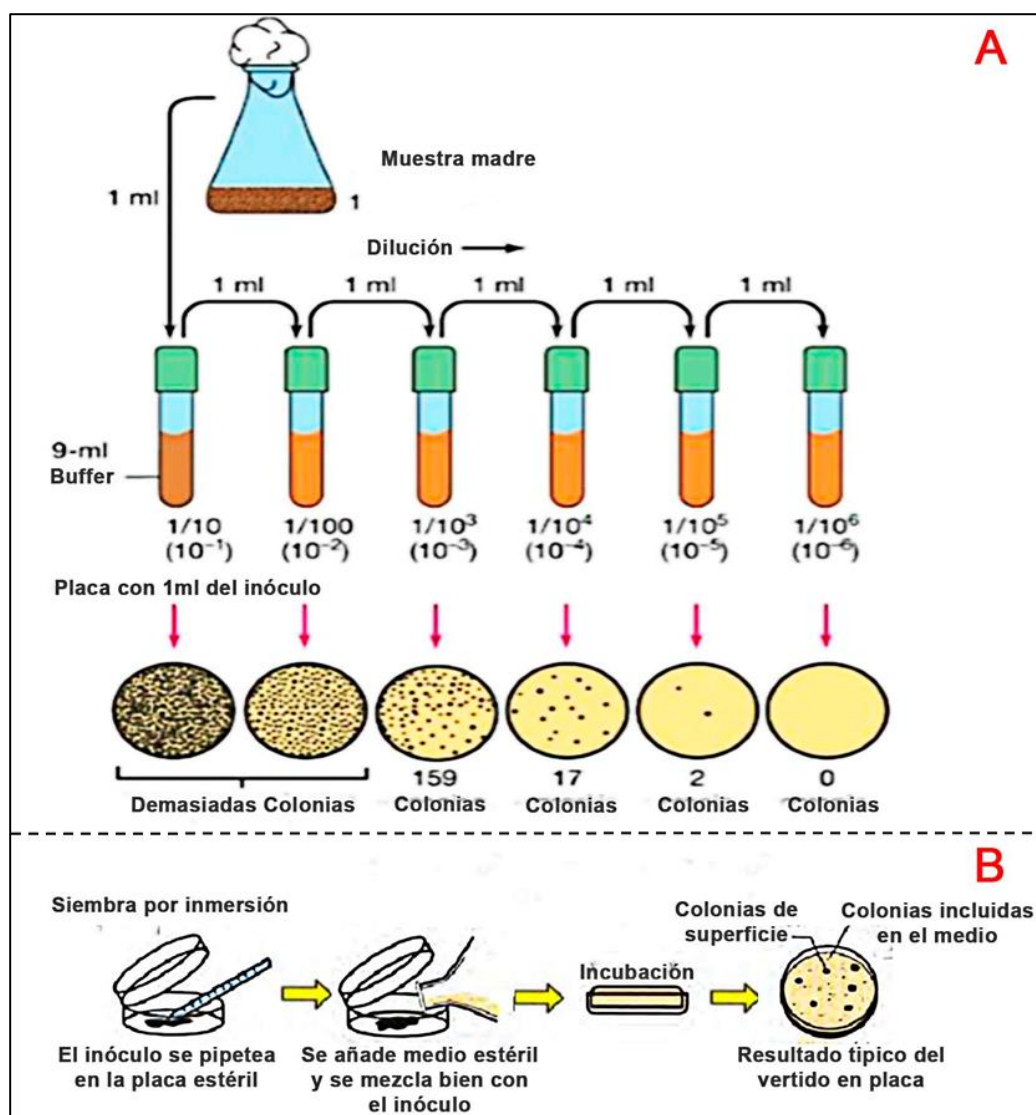


Figura 13. Procedimiento de diluciones seriadas de la muestra y técnica de siembra por inmersión. A. Diluciones seriadas de la muestra desde 10^{-1} hasta 10^{-6} y B. Inoculación de la muestra diluida en placa de Petri (Madigan *et al.*, 2006).

4.4.3 Selección y purificación de las colonias microbianas

La siembra masiva de las muestras dejó como resultado el crecimiento de diferentes colonias microbianas. Al tener las placas con cultivos mixtos se procedió al aislamiento de cada especie observada según su morfología hasta determinar con la observación microscópica que se contaba con cultivos axénicos, tomando en cuenta si se trataba de una bacteria, de un hongo filamentoso o de una levadura en apariencia. Este proceso de examinación de los cultivos mixtos se realizó durante 7 días cuando se agotó el crecimiento bacteriano y 14 días en las placas PDA cuando terminaron de crecer todas las colonias fúngicas (Páramo-Aguilera, 2012). Las técnicas de aislamiento aplicadas para obtener los cultivos axénicos fueron, la siembra en estría para las colonias bacterianas y levaduriformes y la siembra por punción para las colonias fúngicas filamentosas.

Aislamiento y purificación de bacterias

Las placas de Petri con la primera inoculación de las muestras fueron retiradas de la incubadora después de 24 horas para ser examinadas y seleccionar las colonias bacterianas en función de las características morfológicas distintas (color, forma, consistencia, etc.), observadas en los cultivos mixtos en el Contador de colonia QUEBEC Mod. 3327. El aislamiento de las bacterias se realizó en medio Agar Luria-Bertani utilizando la técnica de siembra en estrías (**Figura 14**), dicha técnica se hizo por duplicado en condiciones asépticas en una Cabina de flujo laminar TELSTAR Mod. AV-100. Las placas se incubaron por 24 h a 35°C. Los repiques sucesivos o resiembras se realizaron tomando el inóculo de las colonias que crecían aisladas en las últimas estrías hasta obtener un cultivo axénico (Cuervo, 2010).

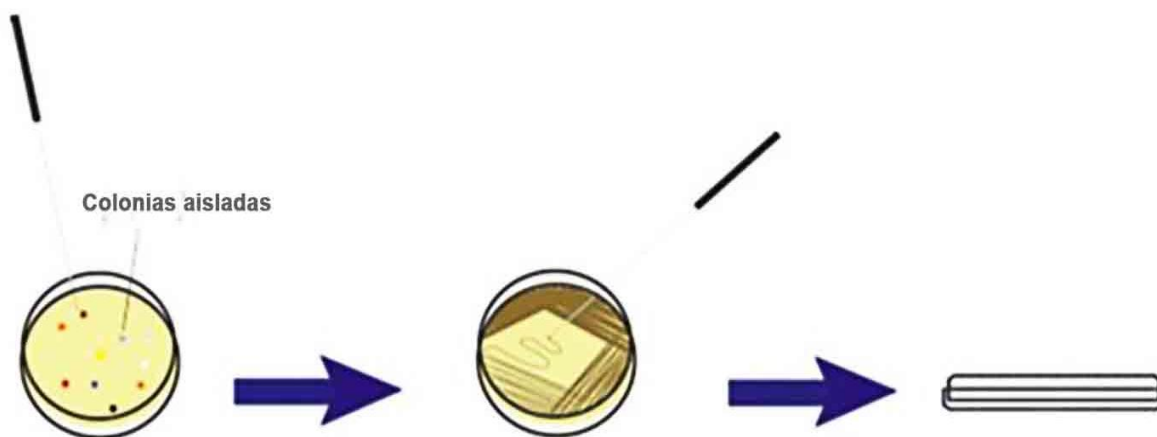


Figura 14. Técnica de siembra en estrías o disseminación aplicada para aislar las colonias bacterianas de los cultivos mixtos (Moreno y Albarracín, 2012).

Aislamiento y purificación de hongos

Los cultivos mixtos en las placas de Petri con medio PDA se examinaron desde el día 1 hasta el día 14 de incubación para observar el crecimiento completo de las colonias fúngicas tanto filamentosas como levaduriformes.

Se seleccionaron las colonias que presentaban aspectos diferentes en su morfología macroscópica (micelio). Los hongos filamentosos se aislaron tomando filamentos o trocitos del micelio con el asa de siembra recta siguiendo la técnica de siembra por punción (**Figura 15 A-B**) y los hongos levaduriformes se aislaron utilizando la técnica de siembra en estrías, misma que se utilizó para aislar las colonias bacterianas. Ambas técnicas de aislamiento se realizaron en condiciones asépticas en la Cabina de flujo laminar, sembrando por duplicado en el medio PDA. Las placas fueron puestas en incubación a 35°C entre 3 y 7 días dependiendo del requerimiento de tiempo para el crecimiento de cada hongo en particular. Los repiques sucesivos fueron necesarios hasta obtener un cultivo axénico (**Figura 15 C**) (Solano, 2006).

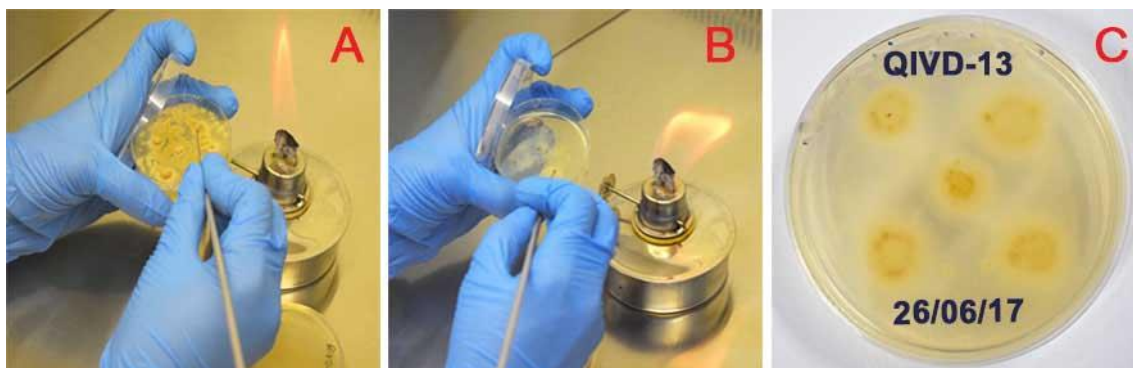


Figura 15. Aislamiento de hongos filamentosos mediante la técnica de siembra por punción. A. Micelio del hongo tomado con el asa de siembra recta, B. Transferencia del micelio al medio de cultivo PDA y C. Crecimiento puro de un hongo filamentosos (Fuente propia).

4.5 Conservación de los microorganismos

Los cultivos axénicos de microorganismos se conservaron usando el método de transferencia periódica que consiste en inocular las cepas a un medio de cultivo fresco en intervalos que aseguren la viabilidad de este (Hernández y Loaiza, 2014). La transferencia se realizó en medio LB para bacterias y medio PDA para hongos filamentosos y levaduriformes, utilizando las técnicas de siembra en estría y punción en dependencia del tipo de microorganismo. Los inóculos se dejaron en incubación por periodos de 24 h para bacterias y un lapso de 3 a 14 días para hongos, para permitir el máximo crecimiento de los microorganismos antes de ser conservados. Los subcultivos se almacenaron en un refrigerador FRIGIDAIRE, Mod.FRT143DBLW a una temperatura de 10°C, en placas selladas con PARAFILM dentro de bolsas con cierre hermético para evitar el exceso de humedad. Los intervalos entre cada transferencia fueron de un mes aproximadamente.

4.6 Identificación microbiana

La identificación de cada microorganismo o grupos de microorganismos se llevó a cabo preliminarmente realizando pruebas morfológicas desarrolladas hasta el primer nivel de profundidad, la cual puntualiza las bases para la aplicación de las herramientas moleculares de identificación; proceso por el cual los microorganismos se identificaron por género y especie. Las pruebas morfológicas macroscópicas para la identificación microbiana fundamentadas en la sección 5.3.1, hacen referencia a la observación de las características visibles de las colonias. Inicialmente se realizaron cultivos frescos en los medios LB y PDA en dependencia del tipo de microorganismo, bacterias y hongos respectivamente, seguidamente fueron puestos en incubación el tiempo necesario para obtener una colonia bien desarrollada con el fin de garantizar un cultivo axénico y apreciar sin alteraciones sus características. En las pruebas morfológicas microscópica se registraron las características celulares de los microorganismos vistos en el microscopio (tejido celular, forma de esporas, etc.), utilizando diferentes técnicas microscópicas (tinciones, gotas húmedas, entre otras) y técnicas específicas como la tinción de Gram fundamentadas en la sección 5.3.2. Finalmente, este reconocimiento morfológico determinó las condiciones específicas a las cuales fueron sometidos los microorganismos para ser identificados molecularmente.

4.6.1 Pruebas morfológicas desarrolladas para la identificación microbiana

Tinción de Gram en bacterias

Los aislados bacterianos se sometieron a la técnica de tinción de Gram después de 24 horas de incubación siguiendo el procedimiento descrito por López-Jácome *et al.* (2006) (**Figura 16 A-D**), detallada en el **Anexo 1**. El procedimiento permitió observar las formas de las células bacterianas, sus tamaños y agrupaciones, así como su clasificación en Gram positivas o Gram negativas, como respuesta de la pared celular frente a la tinción, determinando con mayor nivel de confianza la pureza de los aislados.

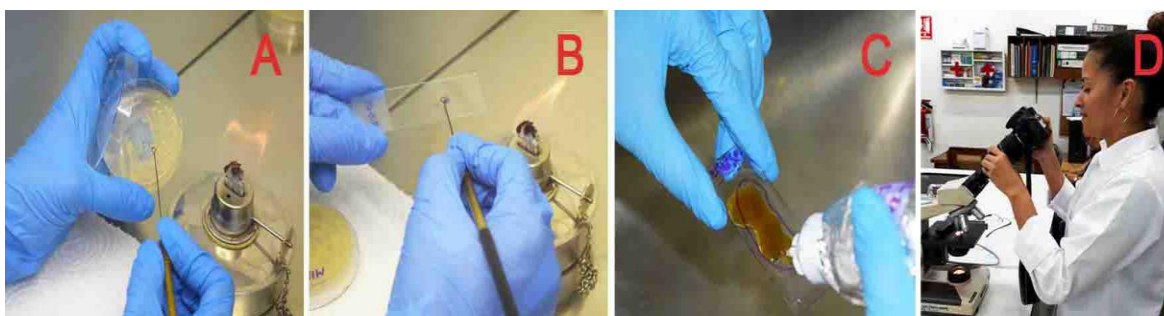


Figura 16. Procedimiento de la técnica de tinción de Gram en bacterias. A. Toma del inóculo en condiciones asépticas, B. Preparación del frotis, C. Adición de los reactivos a la muestra y D. Observación de las características celulares al microscopio OLYMPUS CH-2 con el objetivo 100x (Fuente propia).

Técnica de cinta adhesiva para la observación de esporas en hongos filamentosos

Los hongos filamentosos inoculados en las placas de Petri con medio PDA se dejaron en esporulación a la temperatura del laboratorio ($28^{\circ}\text{C} \pm 1$) en la Cabina de flujo laminar entre 3 y 14 días hasta completar todo su crecimiento. Para observar su morfología microscópica se realizó un montaje con la técnica de cinta adhesiva detallada en el **Anexo 2**, que permite observar las estructuras fúngicas casi sin alteración (**Figura 17**) (Arias y Piñeros, 2008).

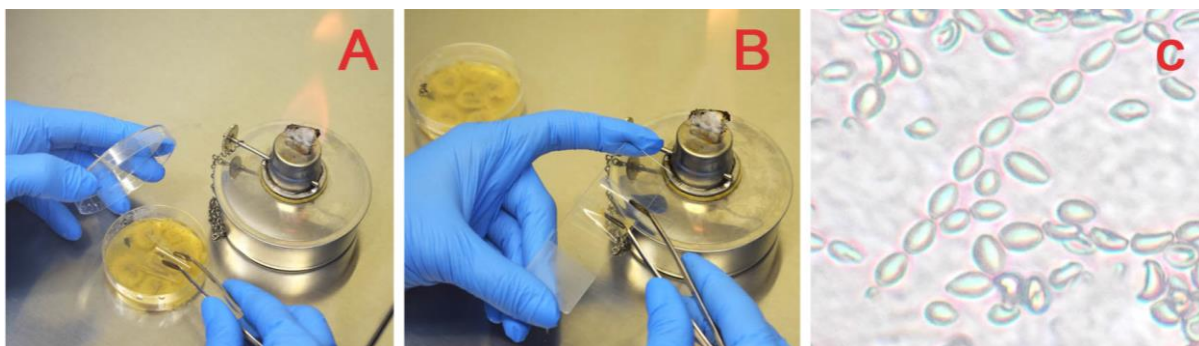


Figura 17. Técnica de cinta adhesiva para la observación de esporas en los hongos filamentosos. A. Toma de esporas del hongo con la cinta pegante, B. Fijación de la cinta pegante sobre el portaobjetos y C. Observación de esporas al microscopio OLYMPUS BH-2 con el objetivo 50x (Fuente propia).

Tinción simple para hongos levaduriformes

La observación de las características microscópicas de las levaduras se realizó a través de la tinción simple en fresco, detallada en el **Anexo 3**, con esta técnica es posible diferenciar la forma celular de los hongos levaduriformes (**Figura 18**) (Moreno y Albarracín, 2012).



Figura 18. Procedimiento de la técnica de tinción simple para levaduras. A. Adición de cristal violeta al inóculo en fresco, B. Ubicación del cubreobjetos sobre la muestra y C. Observación de células levaduriformes al microscopio OLYMPUS CH-2 con el objetivo 50x (Fuente propia).

4.6.2 Identificación molecular

Extracción de ADN, PCR y secuenciación

La caracterización molecular de los microorganismos se realizó mediante estudio del ADN ribosomal, para lo cual se extrajo el ADN por el servicio contratado en el Laboratorio de Biotecnología de la UNAN-Managua y del Centro de Biología Molecular de la UCA. En la compañía MacroGen se contrataron los servicios para la amplificación del ADN por medio de la técnica PCR y la secuenciación del mismo, la cual se realizó mediante el análisis de la región 16S ADNr para bacterias con los primers 27F y 1492R (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' y 5'-TACGGCTACCTTGTACG ACTT-3'), D1/D2/D3 para hongos levaduriformes con los primers LROR y LR7 (5'-ACCCGCTAAGTAAAGC-3' y 5'-TACTACCACCAAGATCT-3') y ITS (Internal Transcribed Space) para hongos filamentosos con los primers ITS1 y ITS4 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' y 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (Ruiz, 2014; Flores y Roque, 2017).

Corrección de errores

La corrección de los errores en los electroferogramas de las secuencias recibidas de MacroGen, constituye el primer paso del análisis. Algunas veces se producen errores durante la secuenciación y se reflejan en el electroferograma de la secuencia; por ejemplo, asignación de dos T existiendo 3, o posiciones ambiguas (N) (Bou *et al.*, 2011). Los electroferogramas fueron corregidos manualmente usando el programa BioEdit v7.0.9 (**Figura 19 A**), se observó la secuencia de bases y se editaron los errores producidos por el secuenciador, posteriormente se guardaron en formato FASTA (**Figura 19 B**). La corrección de errores permite tener un análisis con menor riesgo y mayor precisión, por tanto es necesario hacer una buena corrección para continuar con el análisis bioinformático.

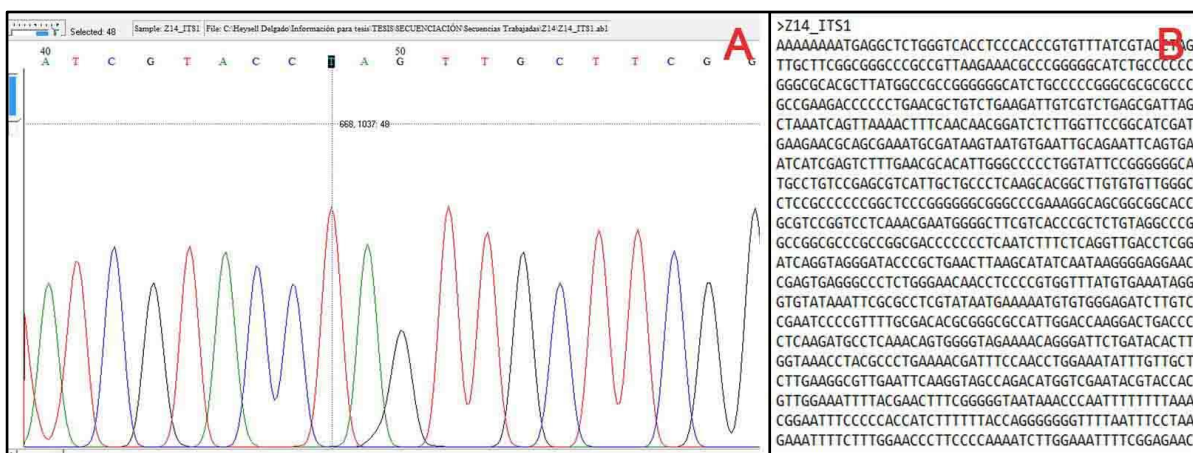


Figura 19. Procedimiento para la corrección de errores en las secuencias. A. Vista del programa BioEdit v7.0.9 para la corrección manual de bases en la secuencia y B. Archivo FASTA guardado luego de la corrección de errores (Fuente propia).

Comparación de secuencias

Las secuencias obtenidas fueron comparadas a través de la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) contra secuencias similares reportadas en Gen Bank del NCBI (National Center for Biotechnology Information), comparando cada secuencia parcial del gen 16S, ITS y D1/D2/D3 para bacterias, hongos filamentosos y levaduras respectivamente (Castillo *et al.*, 2015). Al insertar la secuencia y compararla con otras disponibles en la base de datos con la cual se trabajó, se proporcionó un informe constituido por varias secciones. En la primera sección aparece un gráfico que indica el nivel y el tamaño de los fragmentos alineados, y un listado en orden decreciente de las secuencias de microorganismos con los que se muestra la identidad (**Figura 20**). En la siguiente sección, aparece cada alineamiento de la secuencia problema frente a cada secuencia de otro microorganismo, indicando el número y porcentaje de bases idénticas (Bou *et al.*, 2011).

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

[Alignments](#) [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐	Penicillium janthinellum strain DWJ1(1) 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal trans	830	938	44%	0.0	98%	KM268685.1
☐	Penicillium janthinellum isolate CN2-4-DR-j internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S r	828	931	44%	0.0	98%	MF355386.1
☐	Penicillium janthinellum strain UASW1369 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S r	826	934	44%	0.0	98%	KP881462.1
☐	Penicillium sp. PSF34 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1,	939	939	42%	0.0	98%	HQ850357.1
☐	Penicillium ludwigii CBS 417.68 ITS region; from TYPE material	837	945	45%	0.0	98%	NR_138339.1
☐	Penicillium ludwigii strain CBS 417.68 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S r	837	945	45%	0.0	98%	KF296409.1
☐	Penicillium janthinellum isolate NRRL 35453 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal	837	945	45%	0.0	98%	EF634422.1
☐	Cladosporium sp. CBMAI 1021 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed s	833	940	45%	0.0	98%	GQ370370.2

Figura 20. Fragmento del listado de las secuencias reportadas en Gen Bank del NCBI con las que muestra homología la secuencia problema (Fuente propia).

Alineamiento

Las secuencias fueron alineadas en el programa BioEdit v7.0.9, utilizando la aplicación Clustal W Multiple Alignment for version 1.4 incluida en el menú Accesory (**Figura 21**). La actividad consistía en hacer alineamientos múltiples de cada secuencia en estudio con cinco secuencias elegidas en el BLAST basados en los criterios típicos de selección de secuencias: identidad, frecuencia y máximo score (Rodríguez, 2013). Posteriormente se repitieron los pasos de comparación de la secuencia alineada en el BLAST y la selección de las nuevas cinco secuencias guardadas en formato FASTA para finalmente realizar la construcción de los árboles filogenéticos para bacterias y hongos respectivamente.

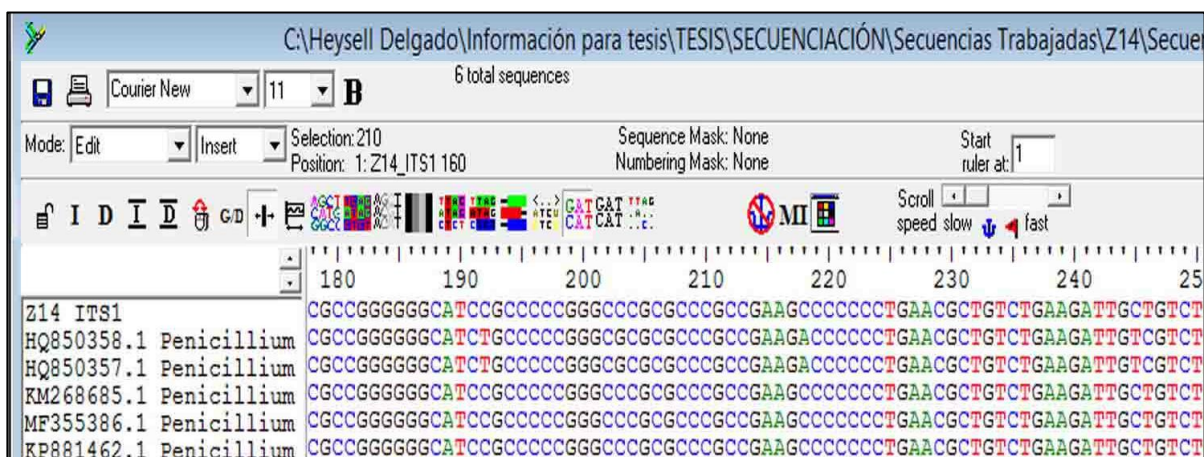


Figura 21. Ventana del programa BioEdit v7.0.9, utilizando la aplicación Clustal W Multiple Alignment for version 1.4 para el alineamiento de la secuencia en estudio con 5 secuencias procedentes de Gen Bank del NCBI (Fuente propia).

Construcción de árboles filogenéticos

Se utilizó el programa MEGA 7.0.14 para la construcción de los árboles filogenéticos, usando el método del vecino más cercano como método de construcción del árbol, y evaluando la confiabilidad haciendo bootstrapping de mil repeticiones, teniendo en cuenta que cada rama se deberá repetir como mínimo en el 50% de las veces (Rodríguez, 2013). Se crearon dos archivos en formato FASTA (bacterias y hongos) que contenían las secuencias en estudio (40 para bacterias y 10 para hongos), además de las seleccionadas en el Gen Bank. Se abrieron los archivos en el programa MEGA, primeramente se eliminaron los gaps, luego se utilizaron las herramientas Align by clustalW y Phylogenetic analysis para alinear las secuencias y hacer el análisis filogenético, y finalmente se elaboraron los arboles de relaciones evolutivas o filogenéticas con la herramienta Construct/Test Neighbor-Joining.

4.7 Búsqueda de aplicaciones agrícolas e industriales de los microorganismos identificados

Los microorganismos identificados constituyen el producto medular de este proyecto de bioprospección microbiana, porque al disponer de cepas completamente identificadas en el laboratorio, se desencadenan nuevas actividades en el orden científico para aprovechar los beneficios que se derivan de esos microorganismos sabiendo que parte de esos beneficios quedaran sugeridos en esta investigación. Las utilidades biotecnológicas para cada cepa microbiana fueron consultadas en diferentes bases de datos: Google Académico, Scielo, El Sevier, Science Direct y Research Gate sobre el tema de aplicaciones microbiológicas agrícolas e industriales, asociadas al desarrollo de bioprocesos, fundamentalmente las difundidas en los últimos 10 años y se seleccionaron las que reunían rigurosidad científica.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Bioprospección microbiana

En países como China, España, India, México, Cuba, Argentina, Brasil, Chile, Colombia, Ecuador, Venezuela, Costa Rica, Panamá y Nicaragua, varias instituciones académico-científicas han creado áreas temáticas, líneas y proyectos de investigaciones biotecnológicas, basando varios de estos en la bioprospección que se desarrolla a nivel mundial (González, 2011). Sin embargo, este tipo de investigaciones se desarrollan principalmente en países latinoamericanos debido a las condiciones tropicales que prevalecen en la región y como consecuencia de su amplia biodiversidad. Existen varias definiciones de bioprospección, algunas son restrictivas a actividades como buscar sistemáticamente genes, compuestos químicos, proteínas y otros metabolitos que posean valor económico actual o potencial; otras son de mayor perspectiva e incluyen el conocimiento tradicional, la caracterización de los recursos biológico-genéticos (genes, metabolitos primarios y secundarios), la determinación y la evaluación de la acción biológica de sus principios activos, el desarrollo de productos, su comercialización, la implementación de planes de conservación que permitan su uso sostenible, además de la participación de actores en las diferentes etapas del proceso (Cotes *et al.*, 2012).

Esta investigación estuvo orientada a bioprospectar una gama de microorganismos, entre bacterias, hongos filamentosos y levaduras como componentes microbiológicos de ecosistemas artificiales, con la finalidad de encontrar cepas nativas potencialmente útiles para el desarrollo ingenieril de procesos biotecnológicos con énfasis en la agricultura y la industria. Se bioprospectó en dos sitios de muestreos, Quesera artesanal para la producción de lácteos y Planteles mineros para la extracción de Oro, ubicados en el municipio La Libertad, muestreos que se efectuaron el 08 de Mayo y 17 de Septiembre del 2017 respectivamente. Los sitios de muestreo mostraban diversos ecosistemas donde subsisten un sin número de microorganismos, lo que permitió el desarrollo de esta investigación de la cual se obtuvieron los siguientes resultados en correspondencia con los objetivos planteados.

7.1.1 Toma de muestras

Se muestreó en los dos sitios previamente establecidos en la metodología en el acápite 6.3 y como resultado se logró muestrear en los 6 puntos en la quesera artesanal y en los 7 en los planteles mineros, descritos a continuación:

Puntos de muestreo en la quesera artesanal (Figura 22):



Figura 22. Puntos de muestreo en la quesera artesanal. A. Materia prima, B, C y D. Subproductos, E. Desechos sólidos y F. Agua residual (Fuente propia).

- Punto I: Leche fresca tomada directamente del contenedor plástico con capacidad aproximada de 190 L, con 5 h de haber sido ordeñada, presentaba color blanco o ligeramente cremoso y su olor característico.
- Punto II: Leche descremada contenida en un recipiente metálico (aluminio) con capacidad aproximada de 190 L, con presencia de moscas y de color blanco.
- Punto III: Lactosuero fermentado tomado de un recipiente que almacena este subproducto del proceso de coagulación enzimática simple con un fuerte aroma a descomposición, donde se apreciaban residuos de queso y grasa suspendida.
- Punto IV: Lactosuero salado con partículas de grasa suspendida, color amarillo intenso y olor fuerte a fermentación.
- Punto V: Sedimentos de drenaje tomados directamente del piso embaldosado (concreto) donde se trasegaban los desechos arrastrando suero, agua, grasa, tierra, insectos y otros sólidos.
- Punto VI: Agua residual tomada de una pila que contiene todo tipo de desechos que se producen en el proceso y en el lavado de los materiales y equipos de producción, agua residual con sólidos disueltos y olor desagradable.

Puntos de muestreo en los planteles mineros (Figura 23):

- Punto I: Lodo en dique de cola, muestra líquida tomada directamente del dique construido con bloques, el cual contenía residuos mineros de lodos.
- Punto II: Agua residual, muestra tomada en la salida de la tubería que trasiega el agua utilizada en el proceso de extracción de oro, la cual pasa por 5 diques de sedimentación de lodos.
- Punto III: Cola o lama fresca, muestra tomada en la superficie de residuos conocidos como colas (tailings), relaves o jales. Residuos sólidos que se

acumulan en forma de ripios obtenidos al moler las rocas originales que contenían los minerales y mezclar las partículas que se forman con el agua y pequeñas cantidades de reactivos químicos que facilitan la liberación de los metales, con crecimiento de poca vegetación por estar recién apilada.

- Punto IV: Cola o lama vieja, la muestra que se tomó en este punto presentaba características similares a la muestra tomada en el punto III con la diferencia de ser una cola más vieja y por tanto tenía mayor crecimiento vegetal.
- Punto V: Agua residual estancada, muestra de lodo tomada en el drenaje natural de lodos, los cuales se encontraban en reposo debido a que no había buen nivel para el drenaje.
- Punto VI: Sedimentos de drenaje, la muestra de materia orgánica fue tomada en diversos puntos de las paredes del drenaje natural que trasiega los lodos al ambiente, donde había crecimiento de vegetación.
- Punto VII: Suelo de colas, la muestra se tomó en este punto con características similares al punto III, colas que tienen más tiempo situadas en otro plantel minero otro plantel minero y que presentaba un mayor crecimiento de vegetación.



Figura 23. Puntos de muestreo en los planteles mineros. A, B y E. Aguas residuales, C, D y G. Colas, F. Materia orgánica (Fuente propia).

Se tomaron muestras en la quesera artesanal, de lo cual se logró obtener un total de 60 muestras inoculadas en placas de Petri (**Figura 24 A**) distribuidas de manera equitativa en los medios de cultivos preestablecidos en la metodología acápite 6.4.1, 5 muestras tomadas en bolsas de cierre hermético para muestras y 5 muestras tomadas en tubos cónicos estériles (**Figura 24 B**) correspondientes a los puntos I, II, III, IV y VI. Del mismo modo se llevó a cabo la toma de muestras en planteles mineros y se obtuvo un total de 56 muestras inoculadas en placas de Petri (**Figura 24 C**) en los medios de cultivos seleccionados para el estudio (a excepción del AM utilizado con el objeto de coleccionar bacterias lácticas en la quesera), 5 muestras tomadas en bolsas de cierre hermético para muestras y 5 muestras tomadas en tubos cónicos estériles (**Figura 24 D**) correspondientes a los puntos I, II, III, V y VII.



Figura 24. Fracción de las muestras aisladas. A. Muestras en placa de Petri de la quesera artesanal después de 16 h de incubación, B. Muestra en bolsas de cierre hermético y muestras en tubos cónicos estériles de la quesera, C. Muestras en placa de Petri de los planteles mineros después de 7 días de incubación y D. Muestra en bolsas de cierre hermético y muestras en tubos cónicos estériles de los planteles (Fuente propia).

Los procedimientos de muestreo tienen que asegurar que el número y las actividades de los microorganismos no se alteren, de manera no cuantificable durante la recolección y conservación de la muestra. También tienen que asegurar que las muestras son representativas y que no están contaminadas con microorganismos extraños; es decir, el procedimiento seguido debe asegurar que los microorganismos solo proceden del ecosistema que se está examinando (Arias y Piñeros, 2008).

Los puntos para la toma de muestras fueron seleccionados tratando de tener un número de puntos que fuese lo suficientemente representativos de los diferentes ambientes encontrados para cada uno de los sitios muestreados (quesera artesanal y planteles mineros). De esta forma, la quesera artesanal fue muestreada en 6 puntos diferentes que abarcaban desde el depósito de leche fresca (Tal cual llega del ordeño), pasando por diferentes áreas de proceso (descremado, coagulación, prensado y filtrado) y área de efluentes de proceso (**Figura 22**). En el caso de los planteles mineros se seleccionaron 7 puntos que abarcan desde la recepción del material (broza), procesamiento en la rastra, diques de sedimentación, depósitos de colas y aguas residuales de proceso (**Figura 23**).

Las muestras fueron tomadas tal como se describió en metodología y en correspondencia con lo descrito por Arias y Piñeros, 2008. Una vez en el laboratorio, las muestras tomadas fueron incubadas obteniéndose a las 24 horas crecimientos microbianos como los que se muestran en la **Figura 24** (bacterias y hongos), en los que es posible observar el crecimiento de diversos microorganismos en la misma placa de cultivo, tal y como ha sido obtenido en trabajos previos (Páramo-Aguilera *et al.*, 2011; Páramo-Aguilera *et al.*, 2018; Arias y Piñeros, 2008).

7.1.2 Aislamiento y purificación de microorganismos

Con la utilización de las técnicas más comunes para aislamiento y purificación de microorganismos, siembra en estría y por inmersión, se logró coleccionar un total de 163 cultivos puros de microorganismos (aislados), entre ellos 127 bacterias, 30 Hongos filamentosos y 6 hongos levaduriformes como resultado de las 136 muestras que se tomaron en ambos sitios de muestreos. De estos cultivos puros 97 se aislaron en la quesera artesanal y 66 en los planteles mineros. Los resultados obtenidos por muestreo se resumen en las **Tablas 4 y 5** en donde se detalla el número total de aislados por cada punto de muestreo y se definen cuantos cultivos axénicos son bacterianos y fúngicos. Sin embargo, este número no representa el total de microorganismos que subsisten en los ecosistemas muestreados.

Tabla 4. *Resumen cuantitativo de los cultivos axénicos bacterianos y fúngicos aislados de los 6 puntos muestreados en la quesera artesanal, naturaleza y estado de la muestra y su respectiva codificación.*

Naturaleza de la muestra	Estado	Código	No. de Bacterias	No. de Hongos	
				Filamentosos	Levaduriformes
Leche fresca	Líquido	QI	11	2	3
Leche descremada	Líquido	QII	12	4	
Lactosuero fermentado	Líquido	QIII	15		
Lactosuero salado	Líquido	QIV	11	2	
Sedimentos de drenaje	Sólido	QV	19	2	
Desechos residuales	Líquido	QVI	14	2	
Total			82	12	3

Fuente: Propia

Tabla 5. *Resumen cuantitativo de los cultivos axénicos bacterianos y fúngicos aislados de los 7 puntos muestreados en los planteles mineros, naturaleza y estado de la muestra y su respectiva codificación.*

Naturaleza de la muestra	Estado	Código	No. Bacterias	No. Hongos	
				Filamentosos	Levaduriformes
Lodo en dique de cola	Líquido	MI	5	2	1
Agua residual	Líquido	MII	4		
Cola o lama fresca	Sólido	MIII	9	4	1
Cola o lama vieja	Sólido	MIV	7	5	1
Agua residual estancada	Líquido	MV	3		
Sedimentos de drenaje	Sólido	MVI	7	4	
Suelo de colas	Sólido	MVII	10	3	
Total			45	18	3

Fuente: Propia

La primera fase y quizás una de las más importantes para la identificación de un microorganismo es la obtención de un cultivo puro. A continuación, en la **Figura 25** se presenta una fracción de los cultivos puros obtenidos mediante la aplicación de diferentes técnicas de aislamiento a partir de cultivos mixtos del punto de muestreo I en la quesera artesanal y el punto de muestreo III en los planteles mineros. En el **Anexo 4** se presenta la descripción del código de aislamiento de los microorganismos y en los **Anexo 5** y **6** se enlista la codificación de cada cultivo puro aislado en la quesera artesanal y en los planteles mineros.

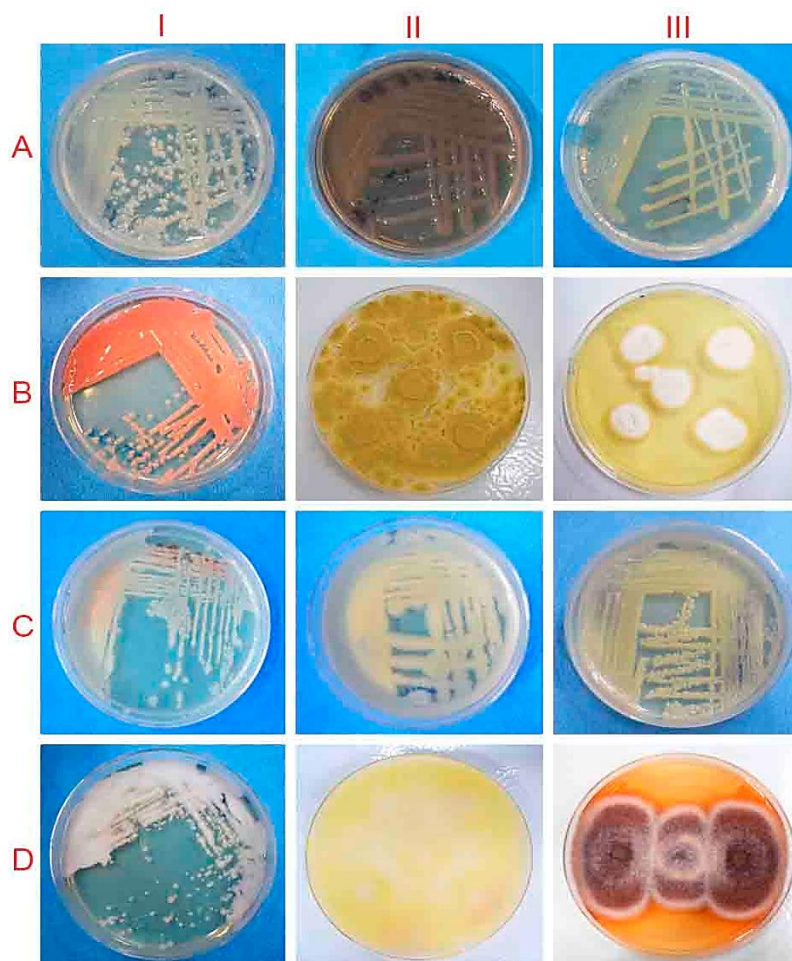


Figura 25. Representación de los cultivos axénicos. AI, AII y AIII. Aislados bacterianos de la quesera artesanal con códigos QIE-08, QIE-11 y QIA-14 respectivamente, BI. Aislado de hongo levaduriforme de la quesera con código QID-09, BII y BIII. Aislados de hongos filamentosos de la quesera con códigos QID-10 y QID-17 respectivamente, CI, CII y CIII. Aislados bacterianos de los planteles mineros con códigos MIIIA-03, MIIIC-06 y MIIIC-07 respectivamente, DI. Aislado de hongo levaduriforme de los planteles con código MIIID-11, DII y DIII. Aislados de hongos filamentosos de los planteles con códigos MIIID-10 y MIIID-14 respectivamente (Fuente propia).

La mayoría de las muestras de suelo, agua o alimentos, contienen numerosas clases de microorganismos, si estos materiales se siembran en una placa con medio sólido se formarán colonias que serán copias exactas del microorganismo original. Las colonias microbianas a menudo tienen un aspecto que distingue los microorganismos entre sí. La mayor parte de los trabajos bacteriológicos requieren cultivos puros y de

esta manera se podrán estudiar las características macroscópicas, microscópicas, fisiológicas, etc. de un microorganismo en particular (Tortora *et al.*, 2007). Diversos autores han realizado trabajos tendientes al aislamiento y purificación de microorganismos partiendo de otros ecosistemas, como: Moreno y Albarracín (2012), aislaron microorganismos a partir de diferentes muestras naturales (aguas, suelo, sedimentos de ríos o lagos, etc.), Páramo-Aguilera, *et al.* (2018 y 2011), aislaron microorganismos procedentes de reservas biológicas, ríos contaminados, queseras artesanales, minerías artesanales, biopelículas en monumentos patrimoniales, etc.

Los resultados obtenidos que se detallan en las **Tablas 4 y 5**, muestran que en la quesera artesanal se obtuvo un total de 97 aislados microbianos desglosados en 82 aislados bacterianos, 12 aislados de hongos filamentosos y 3 aislados de hongos levaduriformes. Por otra parte, en los planteles mineros se obtuvo un total de 66 aislados microbianos que se desglosan en 45 aislados bacterianos, 18 aislados de hongos filamentosos y 3 aislados de hongos levaduriformes. La **Figura 25** ilustra una pequeña muestra de los aislados obtenidos tanto en la quesera artesanal como en los planteles mineros y una visión completa de lo obtenido es posible mediante el análisis de las figuras de los **Anexos 7 al 14** y del **17 al 19**.

Páramo-Aguilera *et al.* (2011 y 2018), obtuvieron cantidades similares de aislados en fuentes diferentes como son los monumentos patrimoniales. Por otra parte, Moreno y Albarracín no reportan cantidades de aislados obtenidas a la fecha de su publicación. Arias y Piñero (2008), trabajando con muestras de suelo, únicamente reportan un total de 64 aislados de hongos filamentosos agrupados en 10 géneros diferentes. Todo esto conlleva a reafirmar lo que ha sido corroborado en estas y otras investigaciones, que conducen a aseverar que la cantidad de aislados y los tipos de aislados que se obtengan de dichos procesos, está en relación directa con los tipos de medios de cultivo que se empleen y las condiciones generales de trabajo de las que se disponga para el desarrollo de la investigación.

7.1.3 Pruebas morfológicas desarrolladas para la identificación microbiana

Casi todos los procesos de identificación microbiana se realizan por medio de métodos convencionales basados en las características fenotípicas, puesto que su realización y costo los hace más accesibles. Los esquemas tradicionales de identificación fenotípica de microorganismos se basan en las características observables macroscópicas y microscópicas, como su morfología, desarrollo, y propiedades bioquímicas y metabólicas (Bou *et al.*, 2011).

En las **Figuras 26 a 29** se ilustran las observaciones macroscópicas y microscópicas realizadas a 40 cultivos puros bacterianos, aislados en la quesera artesanal y en los planteles mineros, los cuales fueron seleccionados de un total de 127 aislados bacterianos que se cultivaron de ambos muestreos, teniendo como único criterio de selección sus características morfológicas, para ser sometidos al proceso de identificación final por vía molecular. En los **Anexos 7 al 14**, se pueden observar estas mismas características para los aislados puros bacterianos no identificados.

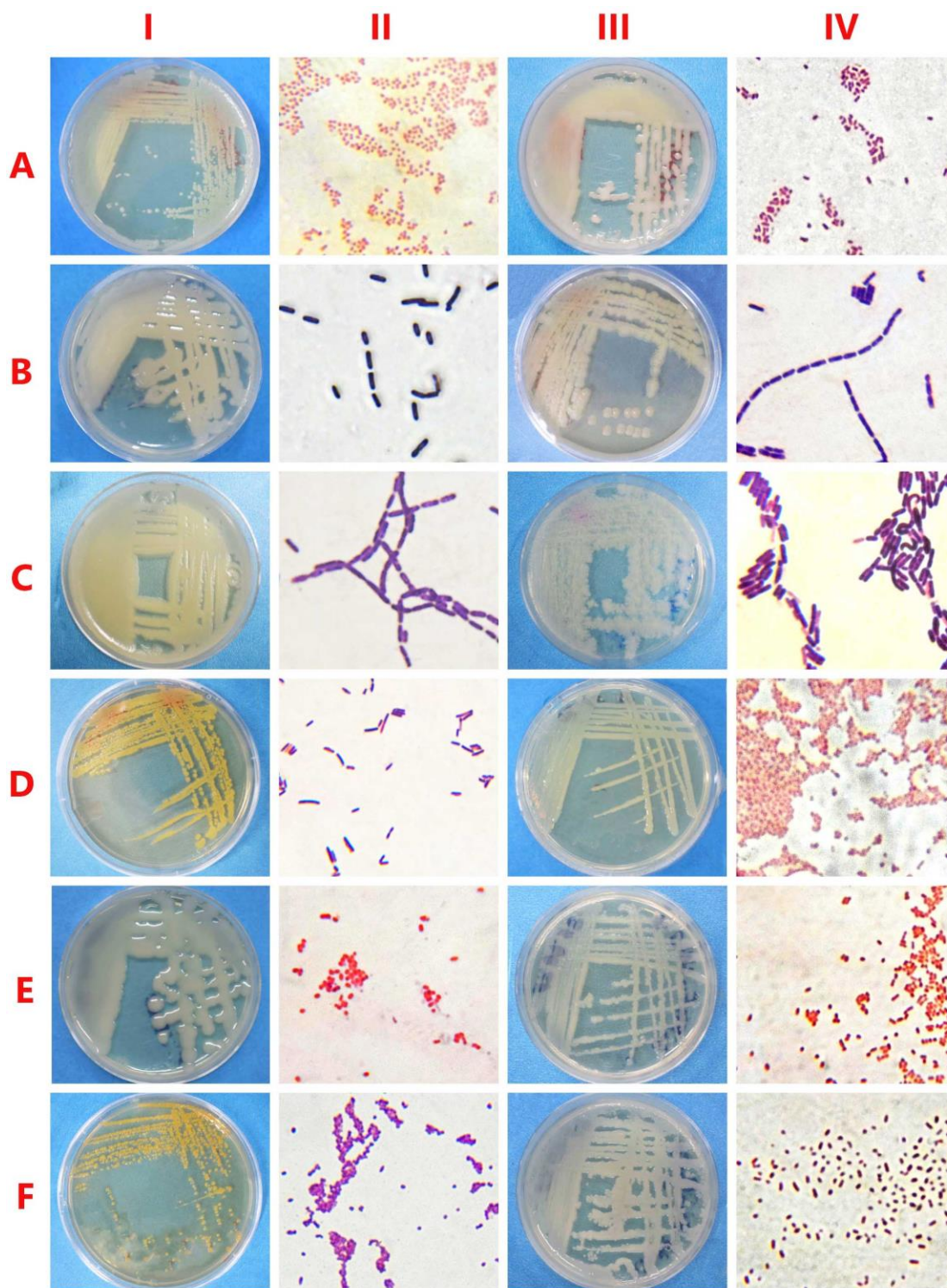


Figura 26. Morfología macroscópica de las bacterias en placa de Petri y su respectiva morfología microscópica en tinción de Gram observada a objetivo 100x, obtenidas en ambos sitios muestreados. AI-AII: *Acinetobacter calcoaceticus*-Gram negativo, AIII-AIV: *Aeromonas hydrophila*-Gram negativo, BI-BII, BIII-BIV, CI-CII y CIII-CIV: *Bacillus cereus*-Gram positivos, DI-DII: *Bacillus marisflavi*-Gram positivo, DIII-DIV Y EI-EII: *Enterobacter cloacae*-Gram negativos, EIII-EIV: *Escherichia coli*-Gram negativo, FI-FII: *Exiguobacterium aurantiacum*-Gram positivo, FIII-FIV: *Klebsiella pneumoniae*-Gram negativo (Fuente propia).

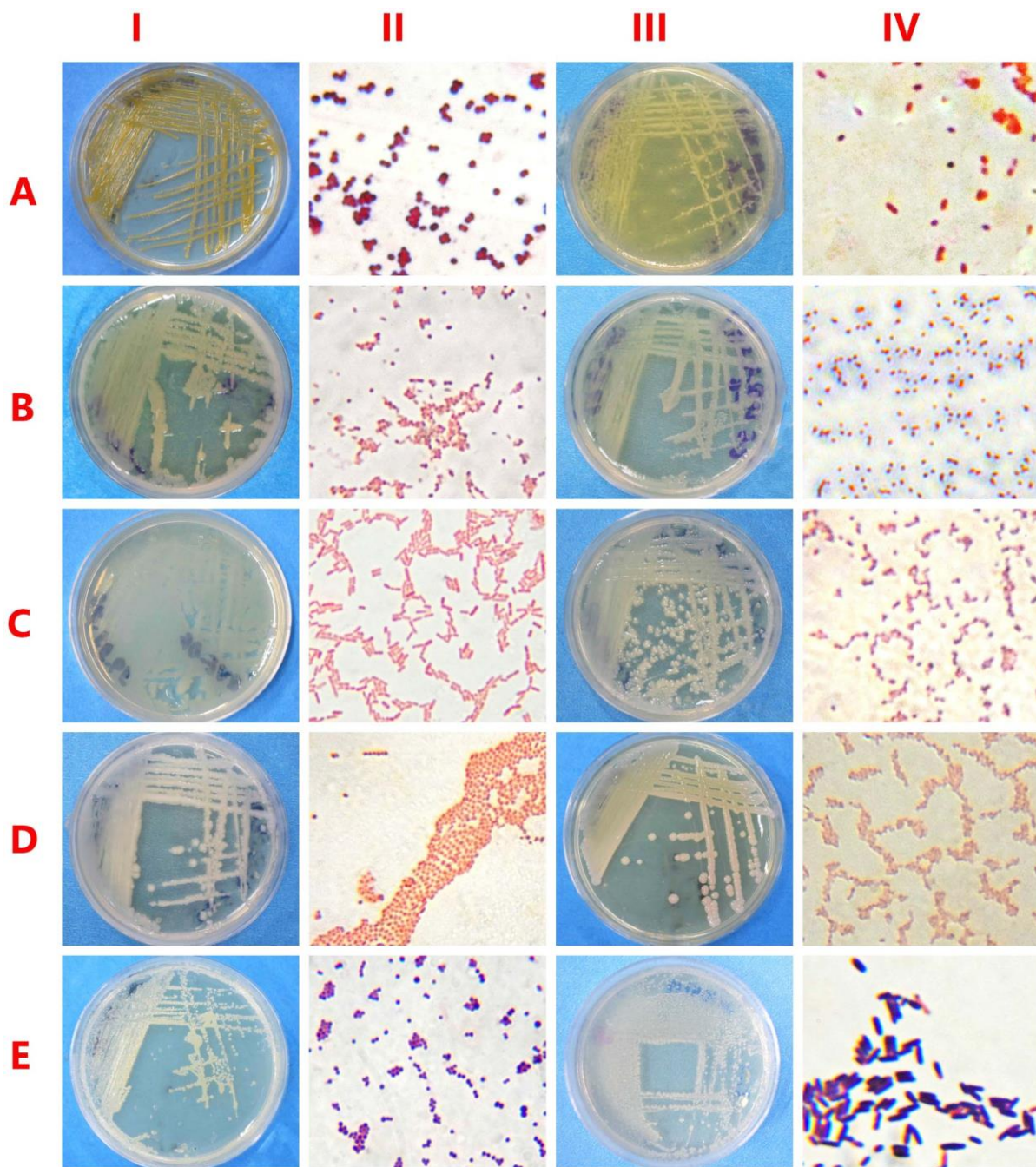


Figura 27. Morfología macroscópica de las bacterias en placa de Petri y su respectiva morfología microscópica en tinción de Gram observada a objetivo 100x, obtenidas en ambos sitios muestreados. AI-AII: *Planococcus maritimus*-Gram negativo, AIII-AIV: *Proteus penneri*-Gram negativo, BI-BII y BIII-BIV: *Pseudomonas aeruginosa*-Gram negativo, CI-CII: *Psychrobacter alimentarius*-Gram negativo, CIII-CIV, DI-DII Y DIII-DIV: *Serratia marcescens*-Gram negativos, EI-EII: *Staphylococcus aureus*-Gram positivo, EIII-EIV: *Terribacillus saccharophilus*-Gram positivo (Fuente propia).

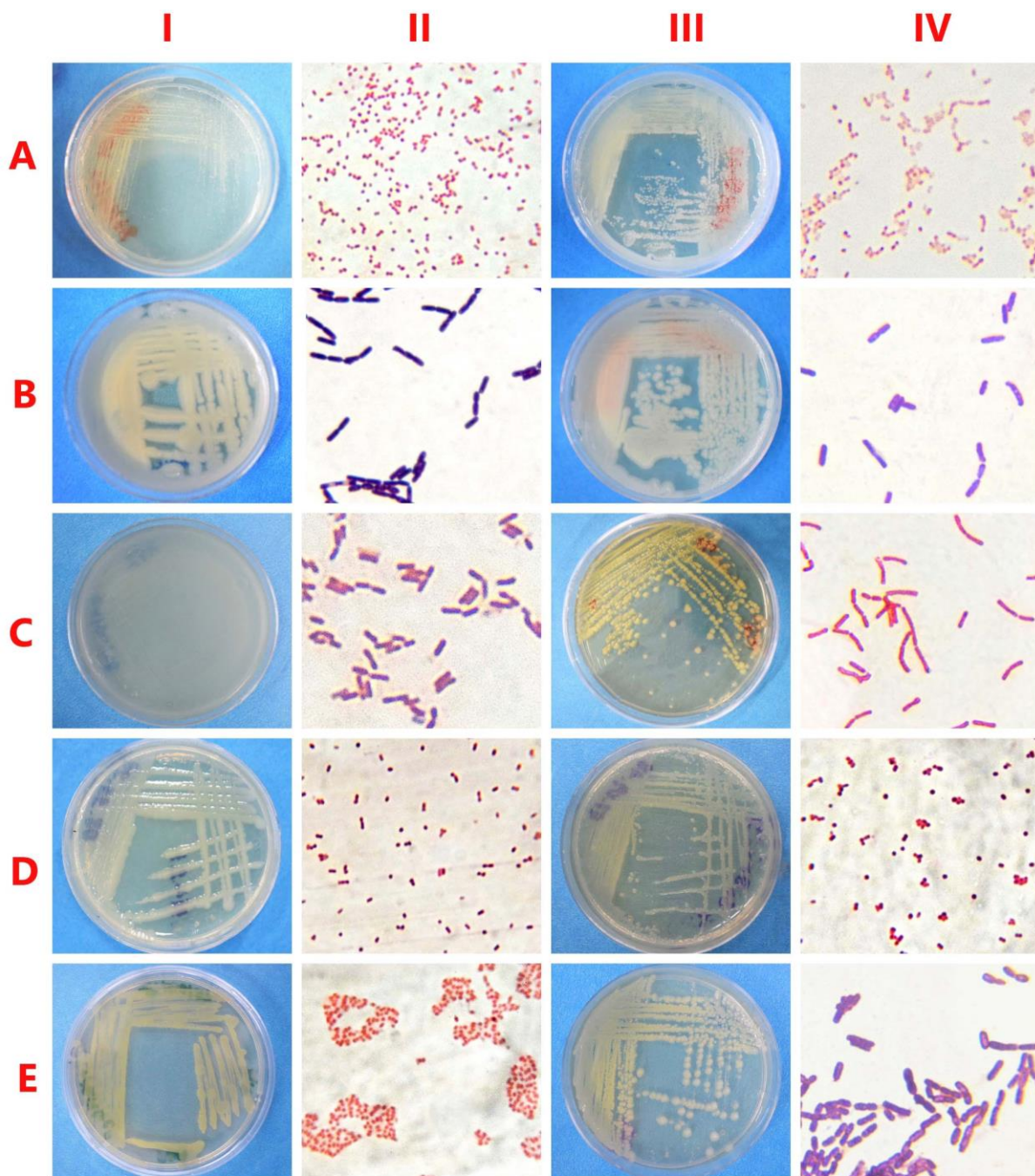


Figura 28. Morfología macroscópica de las bacterias en placa de Petri y su respectiva morfología microscópica en tinción de Gram observada a objetivo 100x, obtenidas en ambos sitios muestreados. AI-AII y AIII-AIV: *Acinetobacter sp*-Gram negativos, BI-BII y BIII-BIV: *Bacillus sp*-Gram positivos, CI-CII y CIII-CIV: *Bacillus sp*-Gram negativos, DI-DII, DIII-DIV y EI-EII: *Enterobacter sp*-Gram negativos, EIII-EIV: *Enterobacter sp*-Gram positivo (Fuente propia).

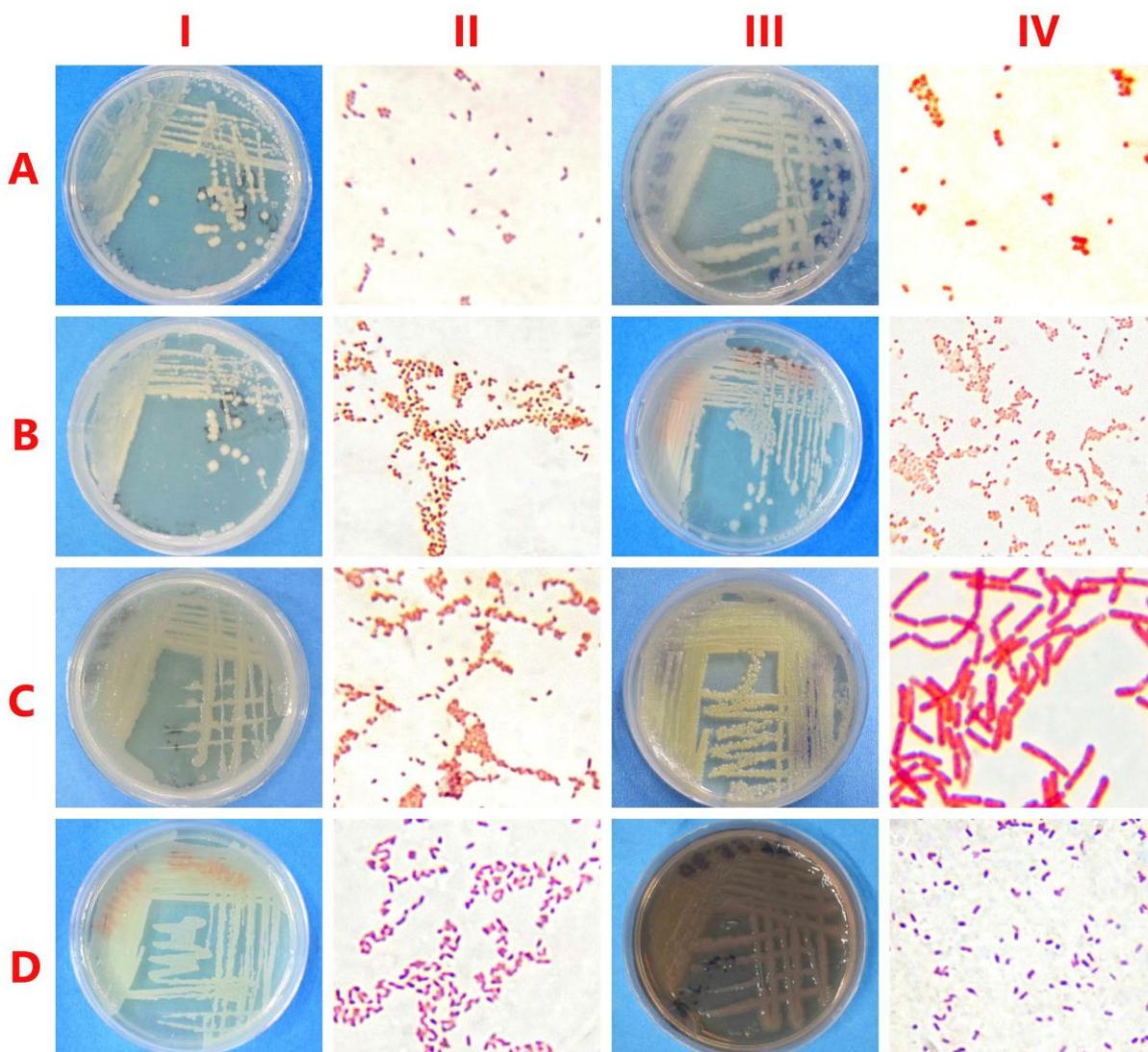


Figura 29. Morfología macroscópica de las bacterias en placa de Petri y su respectiva morfología microscópica en tinción de Gram observada a objetivo 100x, obtenidas en ambos sitios muestreados. AI-AII: *Escherichia sp.*-Gram negativo, AIII-AIV y BI-BII: *Klebsiella sp.*-Gram negativo, BIII-BIV: *Pantoea sp.*-Gram negativo, CI-CII, CIII-CIV y DI-DII: *Pseudomonas sp.*-Gram negativo, DIII-DIV: *Serratia sp.*-Gram negativo (Fuente propia).

En base a las observaciones macroscópicas y microscópicas que se presentaron en las **Figuras 26 a 29** se elaboraron las **Tablas 6 y 7** donde se describen las características morfológicas macroscópicas y microscópicas más comunes observadas en cada uno de los 40 aislados bacterianos seleccionados. En los **Anexos 15 y 16**, se describen las características macroscópicas y microscópicas de los 92 aislados puros bacterianos no identificados.

Tabla 6. *Características morfológicas macroscópicas y microscópicas de las bacterias aisladas en la quesera artesanal.*

Código	Características morfológicas de bacterias	
	Observación macroscópica	Observación microscópica
	Apariencia de la colonia	Resultado de tinción de Gram
MUESTRA I: LECHE FRESCA		
QIA-02	Colonias medianas, superficie umbilicada, con pigmentación verde difusible en el medio y olor afrutado, opacas y mucoides, de forma irregular y bordes ondulados.	Bacilos Gram negativos cortos, dispersos.
QIE-08	Colonias medianas, umbilicadas, rojas o blancas con predominio de las primeras, brillantes y cremosas, de forma puntiforme y bordes redondeados.	Bacilos Gram negativos cortos, dispuestos en racimos.
QIE-11	Colonias medianas y acuminadas, blancas, brillantes y cremosas, de forma fusiforme y circular con bordes redondeados.	Bacilos Gram negativos cortos, dispuestos en racimos.
QIA-13	Colonias medianas, superficie umbilicada, con pigmentación verde difusible en el medio y olor afrutado, opacas y mucoides, de forma irregular y bordes ondulados.	Bacilos Gram negativos cortos, dispersos.
MUESTRA II: LECHE DESCREMADA		
QIIE-10	Colonias medianas, umbilicadas, rojas o blancas con predominio de las primeras, brillantes y cremosas, de forma puntiforme y bordes redondeados.	Bacilos Gram negativos cortos, dispuestos en racimos.
QIIE-11	Colonias medianas, que se curvan de manera convexa, blanquecinas, brillantes y mucoides, de forma fusiforme o circular, con bordes redondeados.	Cocobacilos Gram negativos, dispersos.
QIIC-13	Colonias medianas, superficie plana, producen un sedimento hidrosoluble en el medio de color verde amarillento o azulado, aroma a frutas, brillantes con el centro opaco, de forma circular y bordes redondeados o ligeramente ondulados.	Bacilos Gram negativos cortos, curvos o rectos, dispuestos en pares o en cadenas cortas.
MUESTRA III: LACTOSUERO SALADO		
QIIIB-09	Colonias medianas, acuminadas, blancas, brillantes y cremosas, de forma circular y bordes redondeados.	Bacilos Gram negativos, dispersos o asociados en pares.
QIIIB-10	Colonias medianas, convexas, de color amarillo, brillantes y cremosas, de forma puntiforme y bordes lisos o redondeados.	Cocos Gram positivos, dispuestos en racimos, cadenas cortas o diplococos.
QIIIE-12	Colonias medianas, planoconvexas, blanquecinas, brillantes y cremosas, de forma irregular o fusiforme y bordes redondeados.	Bacilos Gram negativos cortos, dispuestos en cadenas cortas.

Continuación **Tabla 6**

Código	Características morfológicas de bacterias	
	Observación macroscópica	Observación microscópica
	Apariencia de la colonia	Resultado de tinción de Gram
QIIIE-16	Colonias medianas, planoconvexas, blancas, brillantes y viscosas, de forma circular, bordes redondeados y ligeramente ondulados.	Bacilos Gram negativos cortos, dispersos.
MUESTRA IV: LACTOSUERO SIMPLE FERMENTADO		
QIVC-05	Colonias medianas, que se curvan de manera convexa, blanquecinas, brillantes y mucoides, de forma fusiforme o circular, con bordes redondeados.	Cocobacilos Gram negativos, dispersos.
QIVE-08	Colonias medianas, planoconvexas, blancas, brillantes y cremosas, de forma irregular y bordes ondulados.	Bacilos Gram negativos cortos, dispuestos en pares.
QIVB-10	Colonias grandes, planas, poco convexas, amarillentas, brillantes y mucoides, de forma y bordes rizoides con crecimiento en ondas en la superficie del agar a partir del botón de inoculación.	Bacilos Gram negativos cortos, dispersos.
MUESTRA V: SEDIMENTOS DE DRENAJE		
QVB-02	Colonias pequeñas, convexas, de color naranja, brillantes y viscosas, de forma circular y bordes redondeados.	Cocos Gram negativos, dispuestos en racimos.
QVE-06	Colonias medianas, planas, poco convexas, amarillentas, opacas y cremosas, de forma irregular y ligeramente rizoides y bordes ondulados.	Cocos Gram negativos, generalmente asociados en pares (diplococos).
QVD-20	Colonias medianas, planoconvexas, blancas, brillantes y cremosas, de forma irregular y bordes ondulados.	Bacilos Gram negativos cortos, dispuestos en pares.
QVD-21	Colonias medianas, que se curvan de manera convexa, blanquecinas, brillantes y mucoides, de forma fusiforme o circular, con bordes redondeados.	Cocobacilos Gram negativos, dispersos.
MUESTRA VI: AGUAS RESIDUALES		
QVIB-08	Colonias medianas, planoconvexas, blanquecinas, brillantes y mucoides, de forma circular, bordes redondeados y ligeramente ondulados.	Bacilos Gram negativos cortos, dispersos.
QVIE-11	Colonias medianas, planoconvexas, blancas, brillantes y viscosas, de forma circular, bordes redondeados y ligeramente ondulados.	Bacilos Gram negativos cortos, dispersos.
QVIA-12	Colonias medianas, umbilicadas, rojas o blancas con predominio de las primeras, brillantes y cremosas, de forma puntiforme y bordes redondeados.	Bacilos Gram negativos cortos, dispuestos en racimos.
QVIE-17	Colonias grandes y planas, blanquecinas, brillantes y húmedas, viscosas, de forma irregular y bordes ondulados.	Bacilos Gram positivos en forma de bastón, con esporas ovoideas, dispuestos en cadenas cortas.

Fuente: Propia

Tabla 7. *Características morfológicas macroscópicas y microscópicas de las bacterias aisladas en los planteles mineros.*

Código	Características morfológicas de bacterias		
	Observación macroscópica	Observación microscópica	
	Apariencia de la colonia	Resultado de tinción de Gram	
MUESTRA III: COLA O LAMA FRESCA			
MIIIA-01	Colonia crema, opaca, formar circular, borde ondulado, superficie plana y consistencia cremosa.	Estreptobacilos grandes positivos.	Gram
MIIIA-03	Colonia blanca, opaca, forma circular, borde lobulado, superficie plana y consistencia seca.	Cocos pequeños negativos.	Gram
MIIIB-04	Colonia crema y traslucida, brillante, forma puntiforme, borde entero, superficie plana y consistencia cremosa.	Cocos medianos negativos.	Gram
MIIIC-06	Colonia crema, opaca, forma circular, borde ondulado, superficie plana y consistencia cremosa.	Estreptobacilos grandes positivos.	Gram
MIIIC-07	Colonia amarilla, brillante, forma circular, borde ondulado, superficie convexa y consistencia cremosa.	Estreptobacilos grandes negativos.	Gram
MUESTRA IV: COLA O LAMA VIEJA			
MIVB-01	Colonia amarilla, brillante, forma circular, borde entero, superficie convexa y consistencia cremosa.	Bacilos pequeños positivos.	Gram
MIVB-02	Colonia blanca, brillante, forma puntiforme, borde liso, superficie convexa y consistencia cremosa.	Bacilos pequeños positivos.	Gram
MIVB-11	Colonia blanca, brillante, forma puntiforme, borde liso, superficie convexa y consistencia cremosa.	Cocobacilos pequeños negativos.	Gram
MIVC-13	Colonia crema, brillante, forma circular, borde ondulado, superficie convexa y consistencia seca.	Diplobacilos grandes positivos.	Gram
MUESTRA V: AGUA RESIDUAL ESTANCADA			
MVB-02	Colonia blanca, brillante, forma circular, borde liso, superficie convexa y consistencia mucoide.	Cocos medianos negativos.	Gram
MUESTRA VI: SEDIMENTOS DE DRENAJE			
MVIA-01	Colonia blanca, brillante, forma circular, borde entero, superficie convexa y consistencia cremosa.	Cocos grandes Gram negativos.	
MVIB-02	Colonia amarilla, brillante, forma circular, borde entero, superficie convexa y consistencia cremosa.	Cocos grandes Gram positivos.	
MVIB-07	Colonia blanca, brillante, forma puntiforme, borde liso, superficie convexa y consistencia cremosa.	Cocos medianos negativos.	Gram
MVIC-08	Colonia blanca, opaca, forma irregular, borde lobulado, superficie plana y consistencia seca.	Diplobacilos medianos positivos.	Gram

Continuación **Tabla 7**

Código	Características morfológicas de bacterias			
	Observación macroscópica		Observación microscópica	
	Apariencia de la colonia		Resultado de tinción de Gram	
MVIC-09	Colonia blanca, opaca, forma circular, borde ondulado, superficie plana y consistencia seca.		Diplobacilos positivos.	medianos Gram
MUESTRA VII: SUELO DE COLAS				
MVIIA-01	Colonia crema y traslucida, sin apreciación de forma y borde, superficie plana y consistencia cremosa.		Diplobacilos negativos.	medianos Gram
MVIIC-03	Colonia blanca, brillante, forma irregular, borde lobulado, superficie plana y consistencia cremosa.		Bacilos negativos.	pequeños Gram
MVIIB-08	Colonia crema, brillante, forma circular, borde entero, superficie plana y consistencia seca.		Diplobacilos negativos.	grandes Gram

Fuente: Propia

Las tinciones que se usan (simples, diferenciales y especiales) para teñir los preparados de bacterias, permiten observar su morfología, su agrupación, la presencia de esporas y la existencia de otros tipos celulares. Las diferenciales (por ejemplo, la coloración de Gram) además de lo anterior, permite la diferenciación de las bacterias porque usan diferentes colorantes que se comportan distinto según el microorganismo en cuestión. Estas pruebas se basan en la afinidad que presentan los colorantes por las estructuras bacterianas, los colorantes catiónicos, por ejemplo, cristal violeta y safranina, usados en la coloración de Gram, son atraídos por los componentes de carga negativa de las bacterias como los ácidos nucleicos y los polisacáridos (López-Jácome *et al.*, 2014). En esta coyuntura Monrroy *et al.*, (2013), identificaron y estimaron la abundancia de microorganismos asociados a un sistema de cultivo biofloc, a las cepas aisladas se les efectuaron pruebas morfológicas convencionales para su identificación. Por otra parte, Flores y Roque (2017), caracterizaron por vía morfológica y molecular diferentes aislados procedentes de bioinsumos comerciales.

Los resultados de este trabajo muestran en las **Figuras 26 a 29** para los aislados bacterianos que, de los 40 seleccionados, 27 son de forma bacilar; 8 Gram positivos y 19 Gram negativos y 13 son de forma cocácea; 2 Gram positivos y 11 Gram negativos. Del mismo modo, para los aislados bacterianos no identificados aún (87 en total) que se muestran en los **Anexos 7 al 14**, 34 son de forma bacilar; 19 Gram positivos y 15 Gram negativos y 53 son de forma cocácea; 10 Gram positivos y 43 Gram negativos. En las **Tablas 6 y 7** se puede determinar como resultado de las pruebas morfológicas una gran variedad de características macroscópicas como apariencia de la colonia (color, forma y consistencia) y características microscópicas (respuesta a la tinción Gram, si se trata de cocos, bacilos u cocobacilos) y se describe lo que antes fue planteado y que se puede corroborar según las **Figuras 26 a 29**. En los **Anexos 15 y 16**, se pueden ver las características antes explicadas para los aislados bacterianos aún no identificados.

Monrroy *et al.* (2013), llegaron a través de las pruebas morfológicas a identificar géneros bacterianos como: *Aeromonas*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, etc. En el trabajo de Flores y Roque (2017), se utilizaron las pruebas microbiológicas como un apoyo preliminar de manera que pudieron identificar finalmente por herramientas moleculares bacterias del género *Bacillus* de tipo *subtilis* y *cereus*, además de cepas fúngicas. Esto implica que conocer la morfología de las colonias y de las células bacterianas es fundamental para su identificación y para la diferenciación de los microorganismos en general donde es posible, además de distinguir su morfología, reconocer sus rutas metabólicas. Cabe destacar que a este nivel de diferenciación sobre la morfología microbiana se puede declarar de manera presuntiva que se contaba con bacterias pertenecientes a los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas*, lo que posteriormente fue confirmado mediante la identificación final por vía molecular.

En lo que respecta a los aislados fúngicos, las pruebas morfológicas desarrolladas permitieron observar diversas características como la forma de las células en el caso de los aislados levaduriformes y forma de las esporas para los filamentosos. En las **Figuras 30 y 31** se presenta una muestra representativa de las observaciones macroscópicas y microscópicas realizadas a 10 cultivos puros de hongos, colectados en la quesera artesanal y en los planteles mineros, los cuales fueron seleccionados de un total de 36 hongos aislados (entre filamentosos y levaduriformes) para su posterior identificación molecular en base a sus características. Para observar el resto de los cultivos fúngicos no identificados y su respectiva observación de esporas o células, ver los **Anexos de 17 al 19**.

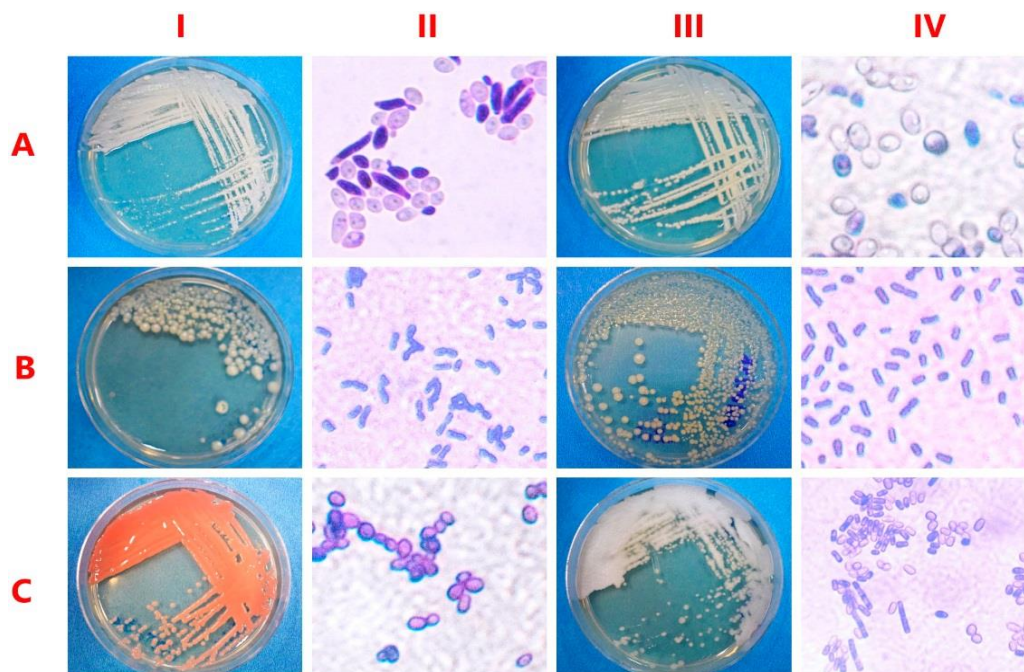


Figura 30. Crecimiento en placa de Petri de los hongos levaduriformes en medio PDA y la observación de sus células al microscopio con un objetivo de 50x, de un total de 6 aislados obtenidos en ambos sitios muestreados. AI-AII: *Candida pararugosa* y células en forma de pera, AIII-AIV: *Cybelindnera jadinii* y células en forma ovalada, BI-BII: *Cybelindnera jadinii* y células en forma ovalada, BIII-BIV: *Pichia jadinii* y células en forma ovalada, CI-CII: *Rhodotorula mucilaginosa* y células en forma ovalada, CIII-CIV: *Trichosporon asahii* y células en forma ovalada (Fuente propia).

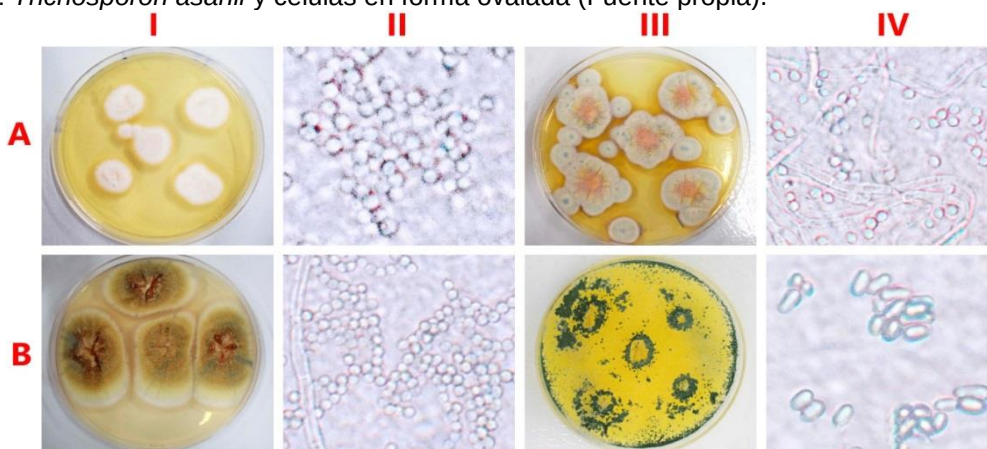


Figura 31. Crecimiento en placa de Petri de los hongos filamentosos en medio PDA y la observación de sus esporas al microscopio con un objetivo de 50x, representación de 4 hongos filamentosos de un total 30 obtenidos en ambos sitios muestreados. AI-AII: *Aspergillus hiratsukae* y esporas en forma redonda, AIII-AIV: *Penicillium janthinellum* y esporas en forma redonda, BI-BII: *Penicillium simplicissimum* y esporas en forma redonda, BIII-BIV: *Trichoderma sp* y esporas en forma ovalada (Fuente propia).

En complemento a las **Figuras 30 y 31** se elaboraron las **Tablas 8 y 9** donde describen las características morfológicas macro y microscópicas más comunes observadas en cada uno de los 10 hongos que se identificaron. Ver **Anexos 20 y 21** donde se describen las características morfológicas macroscópicas y microscópicas de los 26 hongos aun por identificar.

Tabla 8. Características morfológicas macroscópicas y microscópicas de los hongos levaduriformes aislados en la quesera artesanal y los planteles mineros.

Código	Características Morfológicas de Hongos levaduriformes	
	Observación macroscópica	Observación microscópica
	Apariencia de la colonia	Resultado de tinción simple
QUESERA ARTESANAL		
QID-09	Color naranja-rosada, forma circular, borde liso, superficie convexa, brillante y consistencia mucoide.	Célula en forma ovalada, sin observación de núcleo y de diferentes tamaños.
QID-15	Color crema, forma circular, borde liso, superficie convexa, brillante y consistencia mucoide.	Célula en forma ovalada, con observación de núcleo, de diferentes tamaños y reproducción por gemación.
QID-16	Color blanca, forma puntiforme, borde ondulado, superficie elevada, opaca y consistencia rugosa-mucoide.	Célula en forma de pera, con observación de núcleo, de diferentes tamaños y reproducción por gemación.
PLANTELES MINEROS		
MID-08	Color crema, forma circular, borde liso, superficie convexa, brillante y consistencia mucoide.	Célula en forma ovalada, sin observación de núcleo y de diferentes tamaños.
MIID-11	Color blanca, forma puntiforme, borde filamentoso, superficie elevada, opaca, consistencia seca y formación de micelio.	Célula en forma ovalada, con observación de núcleo, de diferentes tamaños, reproducción por gemación y presencia de pseudohifa.
MIVD-09	Color crema, forma circular, borde liso, superficie convexa, brillante y consistencia mucoide.	Célula en forma ovalada con aspecto diplobacilos, con observación de núcleo y de diferentes tamaños.

Fuente: Propia

Tabla 9. Características morfológicas macroscópicas y microscópicas de los hongos filamentosos aislados en la quesera artesanal y los planteles mineros.

Código	Características morfológicas de Hongos de filamentosos			
	Observación macroscópica			Observación microscópica
	Color del cultivo en placa		Apariencia del micelio	
	Anverso	Reverso		
			QUESERA ARTESANAL	
QID-17	Blanco.	Crema y contornos claros.	Colonia algodonosa, forma circular, plana, extendida, margen desflechado, superficie plegada en el centro, crecimiento limitado a los puntos de siembra y consistencia blanda.	Forma redonda, lisa y contorno fino.
QIVD-12	Verde y pigmento amarillo difusible en el medio.	Color amarillo intenso y pigmento difusible en el medio de color amarillo.	Colonia granulosa, forma circular, plana, extendida, sin margen, crecimiento invasivo en la superficie del medio y consistencia seca y mucoide.	Forma ovalada y lisa.
			PLANTELES MINEROS	
MVID-03	Amarillo con gris y contorno blanco.	Crema con centro oscuro.	Colonia polvosa, Forma circular, plana, extendida, margen entero, crecimiento limitado a los puntos de siembra, producción de exudado y consistencia blanda y mucoide.	Forma redonda y lisa.
MVID-11	Blancas con gris azulado y centro café rojizo.	Negro con contorno crema.	Colonia polvosa, forma circular, plana, extendida, margen entero, superficie plegada, crecimiento no solo en los puntos de siembra y consistencia blanda.	Forma redonda y lisa.

Fuente: Propia

Cada día, los estudios de biología molecular constituyen el soporte de toda investigación en el campo taxonómico y biológico, tanto de hongos como de cualquier otro microorganismo. Sin embargo, se considera que aún estas técnicas moleculares no deben ser abordadas en forma única, sino en conjunto con ensayos complementarios, que puedan permitir tener un conocimiento más integral con respecto a los caracteres morfológicos, fisiológicos y genotípicos de las levaduras y hongos filamentosos (Mendoza, 2005). Muchas investigaciones que se han realizado a la fecha, relacionadas con la identificación de hongos filamentosos y levaduriformes. Guerrero *et al.* (2004), obtuvieron levaduras de la flora natural de frutos de manzana colectados en el estado de Chihuahua, México, las cuales se identificaron a nivel de género mediante pruebas bioquímicas y fisiológicas. Arias y Piñeros (2008), aislaron e identificaron hongos filamentosos originarios de los Páramos de Guasca y Cruz verde en Colombia específicamente en la zona de frailejones, identificaron el género y su posible especie teniendo en cuenta las características macro y microscópicas observadas, dentro de esta última la observación de esporas. Páramo-Aguilera *et al.*, (2012), realizaron estudios centrados en la caracterización de la microbiota fúngica cultivable de pátinas biológicas seleccionadas en los alrededores del castillo de Chapultepec, un monumento histórico en la Ciudad de México. Estos últimos autores presentan la identificación de 34 aislados de hongos representativos, seleccionados en base a características macroscópicas diferenciales distintivas de un total de 300 hongos, se caracterizaron utilizando enfoques morfológicos y moleculares. Flores y Roque (2017), mediante la investigación realizada, caracterizaron microbiológica y molecularmente la diversidad microbiana cultivable de bioinsumos comerciales producidos artesanalmente en Nicaragua, específicamente realizaron pruebas morfológicas para bacterias y hongos.

Las pruebas morfológicas desarrolladas para la identificación de hongos levaduriformes y filamentosos permitió la determinación de muchas características macro y microscópicas. En la **Figura 30** se muestran las características de los hongos levaduriformes (color, forma, consistencia y tamaño de las células) las cuales se asemejan a las colonias bacterianas a excepción de *Trichosporon asahii* que al contar con pseudohifas sus colonias se asemejan a las de hongos filamentosos, siendo esta una de las características más importantes que aproximó a su identificación molecular; así mismo ocurre en el caso de la levadura *Rhodotorula mucilaginosa* ya que la colonia presenta un color naranja-rosado lo cual es característico del género *Rhodotorula* sugiriendo su identificación a nivel de género. En la **Figura 31** se muestran las características de los hongos filamentosos (color en placa, apariencia del micelio y forma de spora), en el caso de *Penicillium janthinellum* y *Penicillium simplicissimum* presentan semejanzas en el crecimiento en placa, además de que sus esporas se asemejan porque ambos microorganismos pertenecen al mismo género, pero se diferencian en el color en placa. El *Trichoderma sp* permitió la apreciación de la pigmentación amarilla-verdosa difusible en el medio muy característicos del género. El *Aspergillus hiratsukae* presentó una colonia de tipo algodonoso característico de su género. Una visión completa de las características antes analizadas, es posible al ver las figuras de los **Anexos del 20 y 21**, en las que se presentan los aislados de hongos aun no identificados.

Por otra parte, en las **Tablas 8 y 9** se describen las características macro y microscópicas de los aislados fúngicos identificados. En el caso de hongos levaduriformes se observaron las formas de las células siendo la más común la de forma ovalada y sus tamaños varían de acuerdo al microorganismo que se observó, se determinó si presentaban o no pseudohifas y en algunos casos se observaron células en reproducción. En los hongos filamentosos se observó la forma de las esporas siendo la más común la de forma redonda, además de la variación de tamaño, destacándose en ambos casos las esporas del aislado MIIID-14 por tener la peculiar característica de los hongos de género *Fusarium*. Los aislados QIID-17, QVD-09 y MIVD-07 presentaron esporas hiladas que se asemejan a las del *Aspergillus niger*. Una visión completa de las características más comunes observadas es posible mediante el análisis de las tablas en los **Anexos 20 y 21** para los aislados de hongos no identificados.

Guerrero *et al.* (2004), mediante pruebas bioquímicas y fisiológicas identificaron seis levaduras: dos cepas de *Rhodotorula glutinis*, *Rhodosporidium diobovatum*, *Rhodotorula mucilaginosa* y las tres restantes como *Candida oleophila*. Arias y Piñeros (2008), identificaron hongos filamentosos, siendo la población fúngica de mayor incidencia encontrada los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*. Páramo-Aguilera *et al.* (2012), muestran como basándose en la combinación de metodologías fenotípicas y moleculares es posible diferenciar comunidades de hongos en algunos casos hasta el nivel de especie. Además, se reveló la presencia de una comunidad compleja de hongos representada principalmente por hongos filamentosos pertenecientes a los géneros *Fusarium*, *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Mucor*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis* y el dimorfo *Aureobasidium*, junto con la levadura *Rhodotorula*. Flores y Roque (2017), mediante la investigación para los hongos lograron la identificación de un hongo a nivel de género (*Penicillium*). En definitiva, la observación de las características macro y microscópicas constituyen herramientas valiosas para completar la información para la identificación molecular, que permiten en la mayoría de ocasiones llegar a identificar un hongo hasta nivel de especie. En este trabajo de igual manera que las investigaciones hechas anteriormente se logró sugerir la identidad a nivel de género de algunos microorganismos como son los casos de *Rhodotorula* y *Trichosporum*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Trichoderma*, basado únicamente en sus características morfológicas.

7.1.4 Identificación molecular de microorganismos seleccionados

La ausencia de concordancia entre las características observables del aislamiento en estudio y las correspondientes a la(s) cepa(s) de la especie tipo (no todas las cepas de una misma especie muestran características homogéneas, una misma cepa puede generar diferentes patrones en ensayos repetidos y también las limitaciones en las bases de datos, entre otros), hacen que los métodos fenotípicos realicen la identificación más probable, pero no definitiva. Para solventar los problemas inherentes presentados por los sistemas de identificación fenotípica, se han impuesto a los métodos genotípicos de identificación microbiana como procedimientos complementarios o alternativos. En la década de los 80, comenzó la búsqueda de candidatos que, siendo genes estables, permitieran establecer relaciones filogenéticas entre las bacterias, como los genes que codifican para las subunidades ribosómicas 5S, 16S, 23S y sus espacios intergénicos (Fernández, 2010).

El costo que conlleva la secuenciación de un microorganismo para su identificación por vía molecular es considerablemente alto, por esta razón el proyecto se limitó a identificar solamente 50 microorganismos de un total de 163 que se aislaron, quedando pendiente la identificación de 113 aislados (87 aislados bacterianos y 26 aislados fúngicos filamentosos). El potencial biotecnológico que queda plasmado en este banco de aislados aun por identificar, se espera que se explote con el desarrollo de investigaciones aplicadas en diferentes áreas como, la agrícola e industrial (entre otras) en Nicaragua. La bioprospección microbiana en la quesera artesanal y en los planteles mineros dejó como resultado una gama de microorganismos completamente identificados constituidos por, 18 cepas identificadas a nivel de género y 32 cepas identificadas a nivel de especie en las cuales se distinguen 23 especies diferentes.

Identificación molecular de bacterias

El gen ribosomal 16S es frecuentemente empleado para estudios filogenéticos debido a que es una secuencia altamente conservada entre las diferentes especies de bacterias, el gen se encuentra ubicado en la subunidad pequeña del ribosoma 30S, asociado a esto, el gen ribosomal 16S es una región híper variable lo que prevé especificidad de especie, por lo cual resulta muy útil para la identificación de especies bacterianas (Castillo *et al.*, 2015).

Los 40 aislados bacterianos seleccionados fueron enviados a la compañía Macrogen en Corea del Sur para su secuenciación con los primers 27F-1492R, 22 de estas bacterias fueron aisladas en la quesera artesanal y 18 en los planteles mineros. La compañía Macrogen envió como resultado de sus análisis las secuencias de las bacterias en archivo FASTA, las cuales fueron analizadas (corregidas y alineadas) como se planteó en el acápite 6.5.2 para elaborar el árbol filogenético del cual se presenta una fracción en la **Figura 32**. Las secuencias corregidas y alineadas en formato FASTA se presentan en el **Anexo 22** y el árbol filogenético completo en el **Anexo 23**.

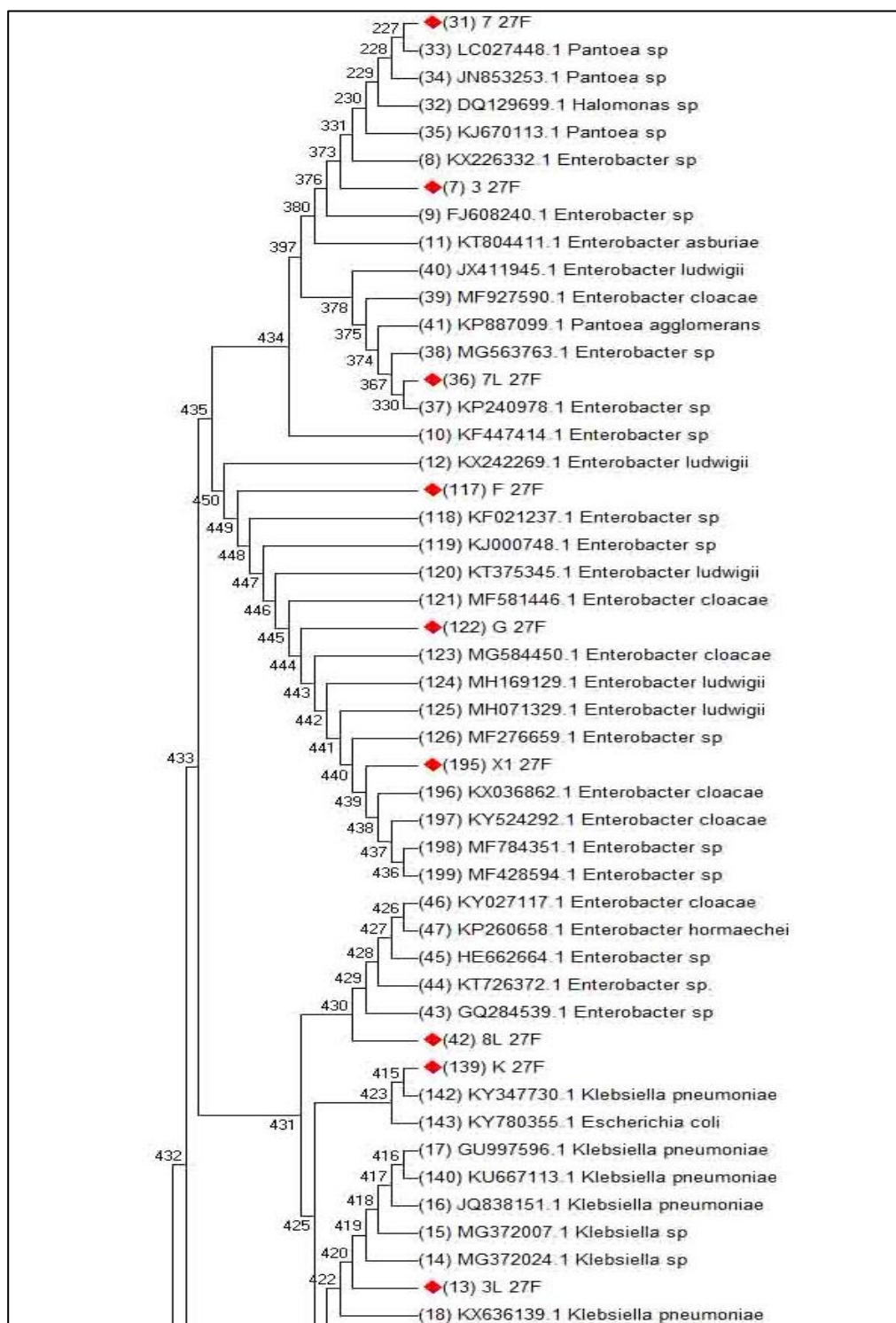


Figura 32. Fragmento del árbol de relaciones evolutivas de las bacterias. La historia evolutiva se infirió utilizando el método del vecino más cercano. Se muestra el árbol óptimo con la suma de la longitud de rama = 4.18061440. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de probabilidad máxima compuesta y están en las unidades del número de sustituciones de bases por sitio. El análisis involucró 226 secuencias de nucleótidos. Se eliminaron todas las posiciones que contienen huecos y datos faltantes. Hubo un total de 363 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA7 (Fuente propia).

Haciendo uso de la **Figura 32**, se obtuvo la identificación final para cada uno de los aislados y se resumen en la **Tabla 10 y 11**, donde se presentan los resultados de la identificación por vía molecular de géneros y/o especies de las 40 bacterias secuenciadas, obtenidos a partir del análisis de las secuencias y por medio del análisis del árbol filogenético de bacterias elaborado en el programa MEGA 7 utilizando el método del vecino más cercano y la información de las secuencias del GenBank que presentaban mayor homología con cada secuencia en estudio.

Tabla 10. *Identificación molecular de 22 cepas de bacterias cultivables procedentes de la quesera artesanal.*

BACTERIAS IDENTIFICADAS EN LA QUESERA ARTESANAL						
Código microorganismos	Muestra	Código secuencia	Vecino más cercano (Numero de Acceso)	Max. score	Iden. máx (%)	Identidad final
QIA-02	Leche fresca	H	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (JX286672.1)	2124	98	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
QIE-08	Leche fresca	X3	<i>Serratia marcescens</i> (MF450442.1)	2089	99	<i>Serratia marcescens</i>
QIE-11	Leche fresca	X2	<i>Serratia sp</i> (KU534524.1)	2002	99	<i>Serratia sp</i>
QIA-13	Leche fresca	26G8	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (HM439966.1)	2266	99	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
QIIE-10	Leche descremada	25	<i>Serratia marcescens</i> (MG786380.1)	2008	99	<i>Serratia marcescens</i>
QIIE-11	Leche descremada	3	<i>Enterobacter sp</i> (KX226332.1)	1284	90	<i>Enterobacter sp</i>
QIIC-13	Leche descremada	D	<i>Pseudomonas sp</i> (LN831925.1)	774	82	<i>Pseudomonas sp</i>
QIIIB-09	Lactosuero simple fermentado	21G2	<i>Escherichia sp</i> (MF429390.1)	2032	99	<i>Escherichia sp</i>
QIIIB-10	Lactosuero simple fermentado	5	<i>Staphylococcus aureus</i> (MG230264.1)	1685	99	<i>Staphylococcus aureus</i>
QIIIE-12	Lactosuero simple fermentado	I	<i>Escherichia coli</i> (MG388227.1)	2204	99	<i>Escherichia coli</i>
QIIIE-16	Lactosuero simple fermentado	3L	<i>Klebsiella sp</i> (MG372024.1)	2089	97	<i>Klebsiella sp</i>
QIVC-05	Lactosuero salado	7L	<i>Enterobacter sp</i> (KP240978.1)	798	89	<i>Enterobacter sp</i>

Continuación **Tabla 10**

BACTERIAS IDENTIFICADAS EN LA QUESERA ARTESANAL						
Código microorganismos	Muestra	Código secuencia	Vecino más cercano (Numero de Acceso)	Max. score	Iden. máx (%)	Identidad final
QIVE-08	Lactosuero salado	X1	<i>Enterobacter cloacae</i> (KX036862.1)	1869	99	<i>Enterobacter cloacae</i>
QIVB-10	Lactosuero salado	1	<i>Proteus penneri</i> (MG685659.1)	1188	99	<i>Proteus penneri</i>
QVB-02	Sedimentos de drenaje	X5	<i>Planococcus maritimus</i> (HM104376.1)	2049	99	<i>Planococcus maritimus</i>
QVE-06	Sedimentos de drenaje	X4	<i>Psychrobacter alimentarius</i> (KT216565.1)	2026	99	<i>Psychrobacter alimentarius</i>
QVD-20	Sedimentos de drenaje	G	<i>Enterobacter cloacae</i> (MG584450.1)	1971	99	<i>Enterobacter cloacae</i>
QVD-21	Sedimentos de drenaje	F	<i>Enterobacter sp</i> (KF021237.1)	1919	99	<i>Enterobacter sp</i>
QVIB-08	Agua residual	23G5	<i>Klebsiella sp</i> (MF429119.1)	2139	99	<i>Klebsiella sp</i>
QVIE-11	Agua residual	K	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (KY347730.1)	1840	96	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
QVIA-12	Agua residual	24G1	<i>Serratia marcescens</i> (KY379045.1)	2239	98	<i>Serratia marcescens</i>
QVIE-17	Agua residual	13	<i>Bacillus cereus</i> (KY622217.1)	1960	99	<i>Bacillus cereus</i>

Fuente: Propia

Tabla 11. Identificación molecular de 18 cepas de bacterias cultivables procedentes de los planteles mineros.

BACTERIAS IDENTIFICADAS EN LOS PLANTELES MINEROS						
Código microorganismos	Muestra	Código secuencia	Vecino más cercano (Numero de Acceso)	Max. Score	Ident. máx (%)	Identidad final
MIIIA-01	Cola o lama fresca	6	<i>Bacillus cereus</i> (KY649378.1)	2174	99	<i>Bacillus cereus</i>
MIIIA-03	Cola o lama fresca	7	<i>Pantoea sp</i> (LC027448.1)	424	80	<i>Pantoea sp</i>
MIIB-04	Cola o lama fresca	M	<i>Acinetobacter sp</i> (KM108508.1)	1653	99	<i>Acinetobacter sp</i>
MIIC-06	Cola o lama fresca	O	<i>Bacillus sp</i> (MG593991.1)	1929	96	<i>Bacillus sp</i>
MIIC-07	Cola o lama fresca	N	<i>Pseudomonas sp</i> (KT321870.1)	2132	99	<i>Pseudomonas sp</i>
MIVB-01	Cola o lama vieja	P	<i>Bacillus marisflavi</i> (KY616828.1)	1916	97	<i>Bacillus marisflavi</i>
MIVB-02	Cola o lama vieja	9	<i>Terribacillus saccharophilus</i> (KX788920.1)	1855	99	<i>Terribacillus saccharophilus</i>
MIVB-11	Cola o lama vieja	19	<i>Bacillus cereus</i> (MH010181.1)	2080	100	<i>Bacillus cereus</i>
MIVC-13	Cola o lama vieja	8L	<i>Enterobacter sp</i> (GQ284539.1)	2025	100	<i>Enterobacter sp</i>
MVB-02	Agua residual estancada	X6	<i>Aeromonas hydrophila</i> (MG428986.1)	2128	99	<i>Aeromonas hydrophila</i>
MVIA-01	Sedimentos de drenaje	R	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (KY091892.1)	2180	99	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
MVIB-02	Sedimentos de drenaje	11	<i>Exiguobacterium aurantiacum</i> (KF848481.1)	1820	96	<i>Exiguobacterium aurantiacum</i>
MVIB-07	Sedimentos de drenaje	S	<i>Acinetobacter sp</i> (KR072554.1)	2150	99	<i>Acinetobacter sp</i>
MVIC-08	Sedimentos de drenaje	T	<i>Bacillus cereus</i> (KY622400.1)	2161	99	<i>Bacillus cereus</i>
MVIC-09	Sedimentos de drenaje	U	<i>Bacillus sp</i> (KY622516.1)	1916	100	<i>Bacillus sp</i>
MVIA-01	Suelo de colas	27AV2	<i>Bacillus sp</i> (GQ340502.1)	2213	99	<i>Bacillus sp</i>
MVIIC-03	Suelo de colas	Q	<i>Pseudomonas sp</i> (MG674361.1)	2012	99	<i>Pseudomonas sp</i>
MVIIB-08	Suelo de colas	20	<i>Bacillus sp</i> (KY490131.1)	1707	97	<i>Bacillus sp</i>

Fuente: Propia

La secuenciación del gen ARNr 16S ha servido como una importante herramienta para determinar las relaciones filogenéticas entre las bacterias, las características de este procedimiento molecular hacen que sea una herramienta útil para el estudio filogenético y para la identificación rutinaria de aislados bacterianos (Bou *et al.*, 2011). Actualmente se desarrollan numerosas investigaciones dentro del marco de la identificación microbiana aplicando las herramientas moleculares para tal fin, en la mayoría de los casos estos trabajos ofrecen resultados convincentes sobre la identidad de sus aislados como es el estudio desarrollado por Flores y Roque (2017), donde obtuvieron exitosos resultados aislando e identificando 15 microorganismos a partir de bioinsumos comerciales producidos artesanalmente. Ruiz (2014), identificó 21 cepas bacterianas con actividad lipolítica aisladas a partir de restos vegetales hortícolas sometidos a compostaje.

En la **Figura 32** se observa como algunas de las bacterias secuenciadas se agrupan correctamente en clados muy bien diferenciados para cada género y su especie. De esta manera fue posible determinar claramente géneros como *Pantoea sp*, *Enterobacter sp* y *Klebsiella sp*. En la figura del **Anexo 23** se pueden apreciar las afinidades filogenéticas de todas las bacterias con su género y su especie. Los resultados de la identificación de las 40 aislados bacterianos se enlistan en las **Tablas 10 y 11** con indicación del género y la especie, su clasificación taxonómica, el número de pares de bases secuenciadas, porcentaje de homología de la secuencia con la correspondiente en el Genbank del NCBI y el número de acceso de la misma.

En su mayoría cada bacteria (aislada) confirma su identidad con el 99% en comparación con las secuencias contenidas en el Genbank. El máximo score se refiere a la puntuación de alineación más alta o cantidad de bases (Adenina, Timina, Citosina y Guanina) de la secuencia problema que coinciden en la misma posición con las bases de las secuencias contenidas en el GenBank. De manera general el proceso de identificación permitió obtener una amplia gama de géneros y especies relacionadas a continuación: *Acinetobacter calcoaceticus* (1), *Aeromonas hydrophila* (1), *Bacillus cereus* (4), *Bacillus marisflavi* (1), *Enterobacter cloacae* (2), *Escherichia coli* (1), *Exiguobacterium aurantiacum* (1), *Klebsiella pneumoniae* (1), *Planococcus maritimus* (1), *Proteus penneri* (1), *Pseudomonas aeruginosa* (2), *Psychrobacter alimentarius* (1), *Serratia marcescens* (3), *Staphylococcus aureus* (1) y *Terribacillus saccharophilus* (1), y entre los bacterias identificadas solo a nivel de género se identificaron los tipos; *Acinetobacter sp* (1), *Bacillus sp* (4), *Enterobacter sp* (4), *Escherichia sp* (1), *Klebsiella sp* (1), *Pantoea sp* (1), *Pseudomonas sp* (3) y *Serratia sp* (1). Todo esto permite que a la fecha se cuente con 15 especies bacterianas diferentes y que están plenamente identificadas, quedando aun por precisar la identificación de las que están identificadas hasta el nivel de género. Las especies plenamente identificadas corresponden a: *Acinetobacter calcoaceticus*, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Bacillus marisflavi*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Exiguobacterium aurantiacum*, *Klebsiella pneumoniae*, *Planococcus maritimus*, *Proteus penneri*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Psychrobacter alimentarius*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus* y *Terribacillus saccharophilus*.

De todos los aislados que quedaron a nivel de género, solamente se destaca el género *Pantoea*, ya que los demás géneros ya están contenidos entre los identificados a nivel de especie, pudiendo encontrarse alguna especie nueva entre las que están por completar hasta especie o repetirse alguna de las que ya se tiene.

Las cepas cuya secuencia tiene una homología (% Identidad) con la depositada en el Genbank del NCBI inferior al 95% pueden ser catalogadas sólo a nivel de género (Tindall *et al.*, 2010). En este caso, todas las secuencias superaron dicho límite, excepto las correspondientes a las cepas con código QIIE-11, QIIC-13, QIVC-05 y MIIIA-03, por lo que el resultado de su identificación a nivel de especie no se puede considerar fiable, aunque se pueden catalogar como pertenecientes al género indicado. Para la correcta clasificación de estas cepas se debería realizar un estudio más profundo, bien obteniendo secuencias de mayor longitud o bien secuenciando otras partes del genoma y realizando análisis fenotípicos complementarios que permitan determinar la especie a la que pertenecen.

En relación con la presencia de las cepas identificadas en los procesos de la quesera y los planteles, todas las especies identificadas han sido aisladas previamente en ambientes característicos de estos procesos (Ruiz, 2014). Las especies de *Bacillus* que en esta investigación reúnen un total de 9 cepas identificadas, tienen la capacidad para sobrevivir a las variaciones térmicas debido a su capacidad para formar endosporas, por ello, constituye uno de los géneros bacterianos dominantes en la mayoría de los componentes ambientales, los resultados de Flores y Roque, (2017), reportan que de 14 aislados bacterianos, 10 corresponden al género *Bacillus* de los tipos *cereus*, *flexus*, *pumilus*, *megaterium* y *subtilis*. Otro de los géneros con mayor incidencia es el de *Pseudomonas* de las cuales se reportan 5 cepas mediante este trabajo y que también formaron parte de los resultados obtenidos por Ruiz (2014). Además, los aislados bacterianos de los géneros *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Serratias* y *Staphylococcus* (muchos de ellos aislados en la quesera artesanal) concuerdan con los resultados obtenidos por Castro (2013), en su trabajo de caracterización de la microbiota nativa del queso Oaxaca tradicional.

Identificación molecular de hongos

Los hongos seleccionados se identificaron molecularmente por la contratación del servicio de secuenciación en la compañía MacroGen y la realización de los análisis de las secuencias recibidas, con lo que fue posible construir el árbol filogenético del cual se muestra una fracción en la **Figura 33**. Las secuencias analizadas (corregidas y alineadas) se presentan en formato FASTA en el **Anexo 24** y el árbol filogenético completo en el **Anexo 25**.

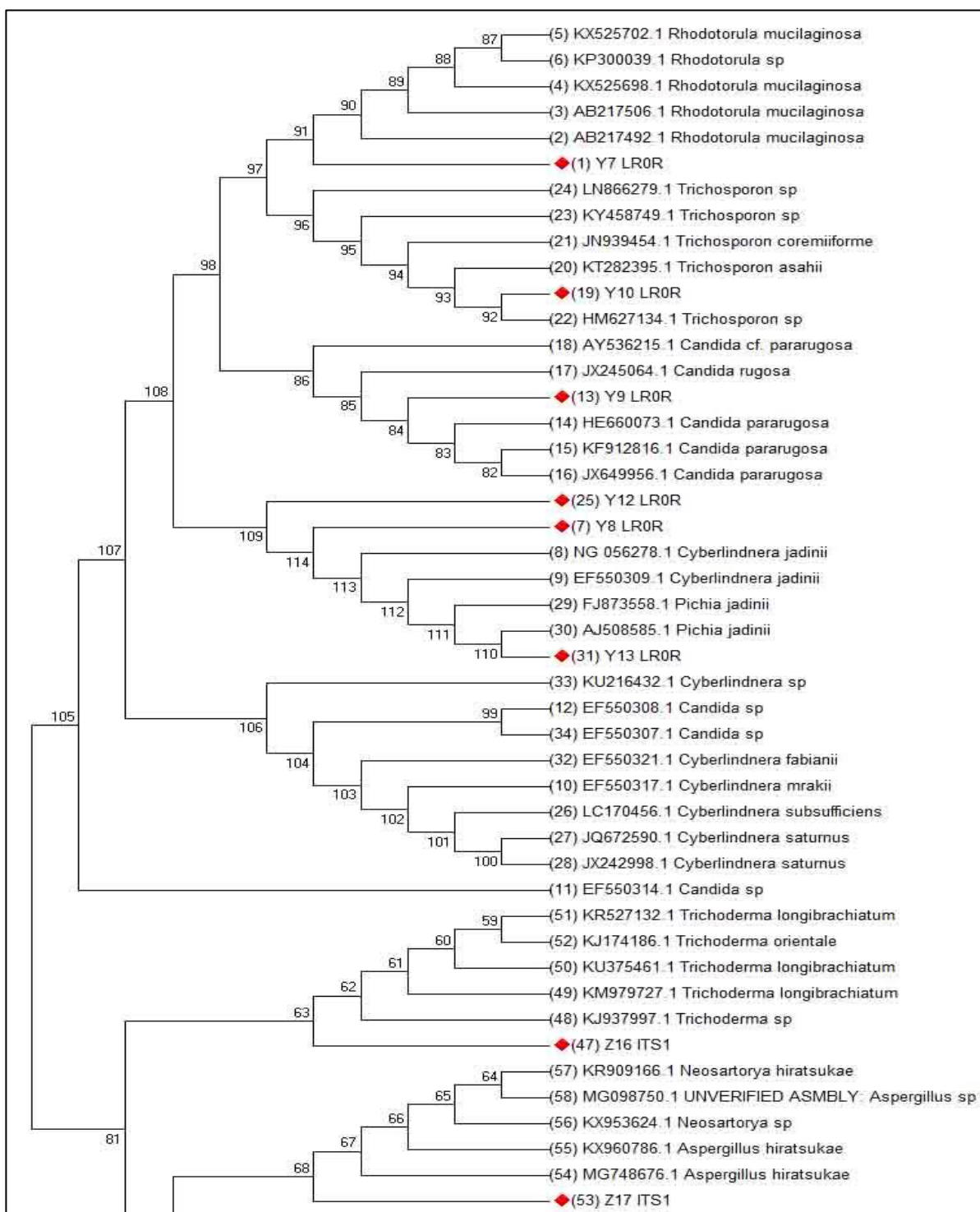


Figura 33. Fragmento del árbol de relaciones evolutivas de los hongos. La historia evolutiva se infirió utilizando el método del vecino más cercano. Se muestra el árbol óptimo con la suma de la longitud de rama = 2.70992492. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de probabilidad máxima compuesta y están en las unidades del número de sustituciones de bases por sitio. El análisis involucró 58 secuencias de nucleótidos. Se eliminaron todas las posiciones que contienen huecos y datos faltantes. Hubo un total de 359 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA7 (Fuente propia).

Haciendo uso de la **Figura 33**, se obtuvo la identificación final para cada uno de los aislados que se resumen en la **Tabla 12** donde se presentan los resultados de la identificación molecular a nivel de género y/o especie de los 10 hongos secuenciados, que finalmente se obtuvo a través de la correlación descrita por el árbol filogenético de los hongos que se elaboró en el programa MEGA 7 utilizando el método del vecino más cercano y la información de las secuencias del GenBank que presentaban mayor homología.

Tabla 12. Identificación molecular de 10 cepas de hongos cultivables procedentes de la quesera artesanal y los planteles mineros.

HONGOS						
Código microorganismo	Muestra	Código secuencia	Vecino más cercano (Numero de Acceso)	Max. Score	Iden. máx. (%)	Identidad final
HONGOS LEVADURIFORMES						
QID-09	Leche fresca	Y7	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (AB217492.1)	1849	100	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
QID-15	Leche fresca	Y8	<i>Cyberlindnera jadinii</i> (NG056278.1)	2132	99	<i>Cyberlindnera jadinii</i>
QID-16	Leche fresca	Y9	<i>Candida pararugosa</i> (HE660073.1)	1000	100	<i>Candida pararugosa</i>
MID-08	Lodo en dique de cola	Y13	<i>Pichia jadinii</i> (AJ508585.1)	660	88	<i>Pichia jadinii</i>
MIID-11	Cola o lama fresca	Y10	<i>Trichosporon asahii</i> (KT282395.1)	1840	99	<i>Trichosporon asahii</i>
MIVD-09	Cola o lama vieja	Y12	<i>Cyberlindnera jadinii</i> (NG056278.1)	621	81	<i>Cyberlindnera jadinii</i>
HONGOS FILAMENTOSOS						
QID-17	Leche fresca	Z17	<i>Aspergillus hiratsukae</i> (MG748676.1)	959	100	<i>Aspergillus hiratsukae</i>
QIVD-12	Lactosuero salado	Z16	<i>Trichoderma sp</i> (KJ937997.1)	880	100	<i>Trichoderma sp</i>
MVID-03	Sedimentos de drenaje	Z15	<i>Penicillium simplicissimum</i> (KM104597.1)	942	100	<i>Penicillium simplicissimum</i>
MVID-11	Sedimentos de drenaje	Z14	<i>Penicillium janthinellum</i> (MF355386.1)	837	99	<i>Penicillium janthinellum</i>

Fuente: Propia

Los métodos moleculares como PCR agilizan la identificación analizando regiones específicas dentro de los genes. Las secuencias ITS son una de las más utilizadas en la identificación, como código de barras estándar para hongos (Lafuente *et al.*, 2016). Hasta la fecha se han realizado varias investigaciones que implican la identificación molecular de hongos filamentosos y levaduriformes. López *et al.*, (2010), aislaron e identificaron molecularmente las levaduras asociadas a las bebidas fermentadas de maíz, piña y arracacha, que son bebidas artesanales producidas en Colombia. Godoy (2013), en su investigación aisló e identificó molecularmente a nivel de especie levaduras nativas *No-Saccharomyces* presentes en uvas. Cardona *et al.* (2012), aislaron e identificaron molecularmente hongos provenientes de tejidos de los tallos infectados de cultivos de vainilla en Colombia. Álvarez *et al.* (2013), realizaron aislamientos de microorganismos de la rizosfera de plantas de vainilla en un cultivo piloto ubicado en el municipio de Sopetrán (Antioquia, Colombia) y posteriormente seleccionaron 52 morfotipos para su identificación molecular por secuenciación de las regiones ITS y 16S del ADN ribosomal para hongos y bacterias, respectivamente. Flores y Roque (2017), a través de la investigación realizada, identificaron molecularmente la diversidad microbiana (incluidos hongos) cultivables de bioinsumos comerciales producidos artesanalmente en Nicaragua.

En el presente trabajo, por medio de la identificación molecular se identificaron a nivel de género y especie las 10 cepas fúngicas seleccionadas. En el fragmento del árbol filogenético que se presenta en la **Figura 33** (ver el **Anexo 25** donde se presenta la figura del árbol filogenético completo y que integra la información) se observa la presencia de clados bien definidos para cada uno de los géneros haciendo más sencilla la identificación a nivel de especies de 6 levaduras (2 *Cybelindnera jadinii*, 1 *Rhodotorula mucilaginosa*, 1 *Candida pararugosa*, 1 *Trichosporon asahii* y 1 *Pichia jadinii*) y 3 hongos filamentosos (*Penicillium janthinellum*, *Penicillium simplicissimum* y *Aspergillus hiratsukae*), mientras que el análisis filogenético con la región ITS, no ofreció una resolución suficiente para determinar la especie del hongo identificado como miembro del género *Trichoderma sp.* Adicionalmente en la **Tabla 12** se detallan los resultados obtenidos de la identificación molecular (vecino más cercano, máximo score y % de máxima identidad) donde se aprecia como en la mayoría de los casos, cada hongo confirma su identidad con un 100% en comparación con las secuencias contenidas en el Genbank.

Las levaduras obtenidas con mayor abundancia por López *et al.* (2010) en las tres bebidas fermentadas fueron *Saccharomyces cerevisiae* (15%), *Pichia guilliermondii* (18%) y *Candida tropicalis* (18%). Godoy (2013), en el estudio logró identificar 26 especies diferentes de levaduras proveniente de uvas por la vía de identificación molecular, entre las especies identificadas se destacó *Hanseniaspora uvarum* con un 50-75% de representación de los aislados. Cardona *et al.* (2012), mediante la secuenciación de las regiones ITS1 y ITS4 y la construcción del árbol filogenético identificaron molecularmente a nivel de especie a los hongos *Lasioidiplodia gonubiensis*, *Lasioidiplodia theobromae* y *Fusarium oxysporum* y a nivel de género *Phoma*, *Arthrinium*, *Bionectria* y *Nigrospora*. Álvarez *et al.* (2013), por análisis de secuencias ITS identificaron cuatro hongos pertenecientes a las especies

Plectosphaerella cucumerina, *Penicillium griseofulvum*, *Bionectria ochroleuca* y *Aspergillus fumigatus* y dos hongos pertenecientes a los géneros *Fusarium* y *Phoma*. De esta manera se comprueba que la identificación molecular por la técnica de PCR para las regiones ITS y D1/D2/D3 constituyen valiosas herramientas de las cuales se obtienen secuencias que al ser analizadas y comparadas con las que se encuentran en el Genbank del NCBI, permiten a través de la elaboración de árboles filogenéticos identificar hongos aislados de diversos ecosistemas. Los resultados de las pruebas morfológicas corroboraron los obtenidos por vía molecular, ejemplo, para los aislados QID-09 y MIID-11 se presumían las identidades a nivel de género como *Rhodotorula* y *Trichosporon* (antes de su identificación) y al ser comparados se confirmó que pertenecen a las especies *Rhodotorula mucilaginosa* y *Trichosporon asahii*, respectivamente; así mismo, sucedió para los hongos filamentosos. Este trabajo, al igual que los trabajos previamente citados, muestra que las pruebas morfológicas unidas a pruebas moleculares constituyen un vehículo adecuado para la identificación microbiana.

7.1.5 Aplicaciones biotecnológicas agrícolas e industriales de las cepas autóctonas identificadas

La identificación molecular permitió finalmente conocer la identidad de los 50 aislados seleccionados para este fin, a partir de los cuales se logró establecer diferentes aplicaciones biotecnológicas en las áreas de interés (agricultura e industria) además de aplicaciones ambientales. Se realizó una búsqueda bibliográfica en bases de datos internacionales para revisar los estudios de desarrollo de bioprocesos donde se aplicaron cepas similares a las cepas autóctonas identificadas.

Los resultados de la búsqueda anterior se reportan en las **Tablas 13, 14 y 15**, donde se resumen las aplicaciones biotecnológicas de 15 cepas de bacterias identificadas a nivel de especie y 8 a nivel de género, 4 cepas de levaduras identificadas a nivel de especie, 3 cepas de hongos filamentosos identificados a nivel de especie y una cepa de hongo filamentoso identificada a nivel de género. Estas aplicaciones sugeridas para cada cepa se sujetan a revisiones bibliográficas de rigor científico, la mayoría publicadas en los últimos 10 años.

Tabla 13. Aplicaciones biotecnológicas de utilidad agrícola e industrial de los aislados bacterianos identificados a nivel de especie, procedentes de la quesera artesanal y los planteles mineros.

Microorganismos	Aplicaciones	Referencias
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	- Activa la vía de síntesis de las giberelinas (GA) principalmente las bioactivas, promoviendo el crecimiento de la planta de pepino al ser utilizada como PGPR ecológico. - Tiene potencial aplicación en la degradación de plaguicidas y en la promoción del crecimiento de la planta, ya que actúa en la solubilización de fosfato, ácido indol-3-acético y en la producción de sideróforo. - Actúa en la purificación de la peroxidasa de lignina para la oxidación de sustratos incluyendo; Mn^{2+}, triptófano, mimosina, L-Dopa, hidroquinona, xilidina, n-propanol, alcohol veratryl y diez tintes textiles de diversos grupos. - Sintetiza sustancias con propiedades emulsionantes y de superficie (SAS y emulgentes) mientras crece tanto en hidrófilos (etanol) como en sustratos hidrófobos (hexadodecano). - Presenta características de utilidad para el diseño de estrategias para la biorremediación de sitios contaminados con hidrocarburos.	Kang <i>et al.</i> (2012) Zhao <i>et al.</i> (2012) Ghodake <i>et al.</i> (2008) Pirog <i>et al.</i> (2009) Marín <i>et al.</i> (1995)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	- A nivel de laboratorio fue reportada como solubilizadora de fosfato. - Posee una alta eficiencia en la remoción de plomo en aguas residuales sintéticas.	Lara <i>et al.</i> (2011) Ramírez <i>et al.</i> (2016)
<i>Bacillus cereus</i>	- Biorremediación de sitios contaminados con cromo hexavalente (Cr^{+6}) con capacidad de tolerar hasta 8000 ppm y remover el 100% del contaminante. - Degradación de petróleo Diesel-2 debido a la interacción de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y el consorcio microbiano propio del ambiente marino (<i>Rhodococcus erythropolis</i>, <i>Bacillus cereus</i> y <i>Pseudomonas fluorescens</i>).	Ramírez y Benítez (2013) Mendoza y Guerrero (2015)
<i>Bacillus marisflavi</i>	Produce carotenoides con niveles máximos de absorción de 455 nm, por lo tanto, forma parte de un consorcio de microbios que degrada los lubricantes.	Wang <i>et al.</i> (2015)

Continuación **Tabla 13**

Microorganismos	Aplicaciones	Referencias
	• Aplicada en biosorción de cromo, ya que es tolerante a concentraciones de hasta 700 mg/L. • Productora de biofloculante a partir del hidrolizado del efluente generado en la molienda del aceite de palma (POME). • Sintetiza nanopartículas de oro que pueden ser utilizadas como nanocatalizador para la degradación del rojo Congo y el azul de metileno.	Mishra y Doble (2008) Nurul-Adela <i>et al.</i> 2016 Nadaf y Kanase (2016)
<i>Enterobacter cloacae</i>	• Muestra una alta actividad solubilizadora de fosfato <i>in vitro</i>. Posee propiedades provechosas para la agricultura sostenible al incidir favorablemente en el crecimiento y desarrollo de plantas de rábano (<i>R. sativus</i> L.).	Lara y Oviedo (2013)
<i>Escherichia coli</i>	• Actúa en la biosíntesis de nanopartículas de oro para su aplicación en la electroquímica directa de la hemoglobina. • Es utilizada para la visualización de superficie promoviendo la exposición de péptidos y proteínas. • Activa los sistemas de transporte de aminoácidos bacterianos fundamentales para el metabolismo celular.	Du <i>et al.</i> (2007) Van <i>et al.</i> (2011) Burkovski y Krämer (2002)
<i>Exiguobacterium aurantiacum</i>	• Produce ácido 3-indol acético (AIA) que contribuye al crecimiento vegetal. • Es utilizada en biorremediación de ambientes contaminados con petróleo por su capacidad de degradar alcanos de largas cadenas (C9-C26, diésel). • Produce un pigmento naranja, cuyo análisis reveló la presencia de carotenoides. Estos carotenoides demostraron actividad antifúngica contra <i>Fusarium sp</i>, <i>Penicillium sp</i> y <i>Alternaria sp</i>. • Tiene la capacidad de crecer en pH alcalino en presencia de metales pesados y condiciones salinas.	Gómez <i>et al.</i> (2012) Mohanty y Mukherji (2008) Shatila <i>et al.</i> (2013) Strahsbürger <i>et al.</i> (2017)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	• Fijadora de nitrógeno; considerada por tanto como una rizobacteria promotora del crecimiento de plantas. • Fermenta los cultivos de alginato de sodio que producen alginato liasa extracelular específica para guluronato usada en biotecnología de algas.	Babalola (2010) Østgaard <i>et al.</i> (1993)

Continuación **Tabla 13**

Microorganismos	Aplicaciones	Referencias
<i>Planococcus maritimus</i>	Se utiliza como agente reductor en la biosíntesis extracelular de nanopartículas de oro, mediante un sencillo procedimiento biológico.	Malarkodi <i>et al.</i> (2013)
	Actúa en consorcio con otras cepas en la degradación de más del 70% del colorante Malachite Green, debido a las actividades enzimáticas hidrolíticas extracelulares y a sus propiedades de biorremediación.	Farha <i>et al.</i> (2018)
	Puede degradar los compuestos BTX (Benceno, Tolueno, Xileno) al utilizarlos como única fuente de carbono para su crecimiento en condiciones aerobias por lo que puede desempeñar un papel importante para la biodegradación de BTX en diferentes sitios marinos contaminados.	Desouky <i>et al.</i> (2015)
	Reduce el cromato incluso en presencia de diferentes iones metálicos divalentes y en condiciones salinas, por lo que puede contribuir de manera prometedora para el tratamiento de cromo hexavalente tóxico presente en aguas residuales industriales salinas.	Subramanian <i>et al.</i> (2012)
	Se utiliza para la producción de biosurfactante (BS) para la captación de petróleo en ambientes contaminados. La producción de estas moléculas bioactivas (BS) juegan un papel fundamental en su adaptación a ambientes adversos ya que tolera concentraciones de hasta 2.7 M NaCl.	Waghmode <i>et al.</i> (2019)
<i>Proteus penneri</i>	Es una bacteria productora de lipasas que catalizan la hidrólisis del triaglicérol y se usan ampliamente como biocatalizadores para la producción de biodiesel.	Korman y Bowie (2012)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Los metabolitos activos de esta bacteria se utilizaron para la formulación de un bioproducto aplicado en un cultivo de tomate favoreciendo el crecimiento, desarrollo y rendimiento global del cultivo.	Terry <i>et al.</i> (2010)
	Productora de lipasas; una enzima que además de catalizar la hidrólisis, cataliza la síntesis de acilglicérols de cadena larga, por lo que es muy utilizada en la industria orgánica.	Jeager y Reetz (1998)
	Degrada eficientemente diferentes tipos de grasas y aceites, incluidos los residuos de aceites comestibles.	Hasanuzzaman <i>et al.</i> (2004)
	Posee una alta capacidad para degradar petróleo Diesel-2 en agua de mar.	Mendoza y Guerrero (2015)

Continuación **Tabla 13**

Microorganismos	Aplicaciones	Referencias
<i>Psychrobacter alimentarius</i>	• Presenta actividad solubilizadora de fosfato relacionado con la liberación de ácidos orgánicos, glucónicos, tartáricos, acéticos y cítricos, aumentando el rendimiento en las plantas de tabaco. • Resistente a iones de metales pesados divalentes (Pb^{2+}, Cu^{2+} y Cd^{2+}), por lo que es ampliamente aplicada en biorremediación.	Gao <i>et al.</i> (2016) Abd-Elnaby <i>et al.</i> (2016)
<i>Serratia marcescens</i>	• Presenta propiedades antagónicas contra patógenos fúngicos en el suelo; <i>Fusarium oxysporum</i>, <i>Phytophthora cinnamomi</i> y <i>Rhizoctonia solani</i>. • Productora de lipasa, la cual hidroliza de forma estereoselectiva el isopropilidenglicerol racémico, que es un componente básico en una variedad de reacciones de síntesis orgánica. • Produce un pigmento rojo biodegradable que puede ser usado en la industria textil, cosmética, farmacéutica, etc.	Kavroulakis <i>et al.</i> (2010) Jaeger <i>et al.</i> (1997) Gulani <i>et al.</i> (2012)
<i>Staphylococcus aureus</i>	• Hasta el momento de la búsqueda no se encontró ninguna aplicación biotecnológica.	
<i>Terribacillus saccharophilus</i>	• Promueve el crecimiento de las plantas estimulando su desarrollo al inducir la biosíntesis de metabolitos secundarios, como los terpenos, que reducen la incidencia de estrés vegetal.	Salomon <i>et al.</i> (2016)

Fuente: Propia

Tabla 14. Aplicaciones biotecnológicas de utilidad agrícola e industrial de los aislados bacterianos identificados a nivel de género procedentes de la quesera artesanal y los planteles mineros.

Microorganismos	Aplicaciones	Referencias
<i>Acinetobacter sp</i>	• Biodegradación de fenol: capaz de eliminar fenol / L en medio líquido y metabolizar el fenol en concentraciones en el tratamiento de aguas residuales que contienen fenol. • Biodegradación de n- alcanos con longitudes de cadena que van desde el decano (C₁₀ H₂₂) al del tetracontano (C₄₀ H₈₂). • Biodegradación de fenol: se utilizó alcohol polivinílico como matriz de gel para inmovilizar células mixtas de dos cepas mediante congelación y descongelación repetidas. • Biodegradación y biorremediación: posee una excelente resistencia al frío, es capaz de eliminar amonio, nitrito y nitrato y eliminación eficiente de DQO y TN de las aguas residuales sintéticas. • Biodegradación: degradan las n- parafinas de cadena larga del aceite de motor de automóvil y también reduce el peso del aceite residual por metabolizaron a través de la vía de oxidación terminal den-canano. • Biosorción: eliminación de cromato [Cr (VI)] en consorcio con <i>Serratia mercascens</i>, fluorescencia de <i>Pseudomonas</i>, <i>Escherichia coli</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.	Wang <i>et al.</i> (2007) Throne <i>et al.</i> (2007) Liu <i>et al.</i> (2009) Yao <i>et al.</i> (2013) Koma <i>et al.</i> (2001) Srivastava y Thakur (2007)
<i>Bacillus sp</i>	• Biosíntesis de α-amilasa: utilizando la metodología de superficie de respuesta. • Biosíntesis: producción de proteasa con la utilización de diversos sustratos. • Biosíntesis: síntesis de nanopartículas de plata en exposición a una solución acuosa AgNO₃. • Biorremediación: decoloración de los colorantes azoicos por enzima azorreductasa. • Biosíntesis de serina proteasa: se purificó mediante cromatografía en columna de Sephadex A-50 y Sepharose 6B, la enzima permanece activa y estable en varios detergentes. • Biodegradación de Cr (VI) por la célula y actividad enzimática.	Tanyildizi <i>et al.</i> (2005) Patel <i>et al.</i> (2005) Pugazhenthiran <i>et al.</i> (2009) Maier <i>et al.</i> (2004). Singh <i>et al.</i> (2001) Elangovan <i>et al.</i> (2006)

Continuación **Tabla 14**

Microorganismos	Aplicaciones	Referencias
	Biodegradación: degradación de plumas de pollo y su residuo y el caldo fermentado se convertirían en un alimento proteico para los animales.	Suntornsuk y Suntornsuk (2003)
<i>Enterobacter sp</i>	- Biosorción de plomo (Pb), cobre (Cu) y cadmio (Cd) utilizando la biomasa. - Bioprotector: inoculación de <i>Burkholderia phytofirmans</i> y <i>Enterobacter sp.</i> en plantas de maíz para protegerse de los efectos inhibitorios del estrés por sequía. - Biodegradación: decoloración del colorante reactivo reactivo Negro 5, también mostró una gran capacidad para decolorar varios tintes textiles reactivos, incluidos los tintes azo y antraquinona. - Biodegradación y biorremediación: degrada el ftalato de dibutilo (DBP) como fuente de carbono y remediación de ftálico ácido de diéster en residuos sólidos municipales en un biorreactor de vertedero. - Bioacumulación de mercurio y biosíntesis simultánea de nanopartículas de mercurio. - Biosíntesis de quitanasa antifúngica usando como sustratos la quitina en escamas, la quitina de concha de cangrejo, el tallo de la seta, la pared celular fúngica, el salvado de trigo y el salvado de arroz.	Lu <i>et al.</i> (2006) Naveed <i>et al.</i> (2014) Wang <i>et al.</i> (2009) Fang <i>et al.</i> (2010) Sinha y Khare (2011) Dahiya <i>et al.</i> (2005)
<i>Escherichia sp</i>	Hasta el momento de la búsqueda no se encontró ninguna aplicación biotecnológica.	
<i>Klebsiella sp</i>	- Biodegradados en un tratamiento microaerofílico-aeróbico secuencial y biodecoloración de tintes azoicos textiles reducción del enlace azo y un proceso oxidativo. - Biosíntesis de pigmento de melanina por hidroxilación de Ltyrosine, se sintetiza por la vía DOPA-melanina. - Biorremediación de suelos y aguas contaminados con atrazina: usa la atrazina como única fuente de carbono y nitrógeno con alta eficiencia de mineralización. - Reducción de molibdato óptimamente a azul de molibdeno usando fosfato 4,5 mM, molibdato 80 mM y usando fructosa al 1% (p / v) como fuente de carbono. - Generación de electricidad: bacteria electroquímicamente activa emplead en un MFC de tipo "H" para la electrogénesis, con glucosa como donador de electrones.	Franciscon <i>et al.</i> (2009) Shrishailnath <i>et al.</i> (2010) Yang <i>et al.</i> (2010) Lim <i>et al.</i> (2011) Xia <i>et al.</i> (2010)

Continuación **Tabla 14**

Microorganismos	Aplicaciones	Referencias
	• Biopromotor: protege a las plantas de los efectos nocivos de los estresantes abióticos.	Singh <i>et al.</i> (2015)
<i>Pantoea sp</i>	• Biosorción de la biomasa bacteriana para el cromo (VI), cadmio (II) y cobre (II): absorción de metal para biomasa seca	Ozdemir <i>et al.</i> (2004)
	• Producción de biosurfactantes durante el crecimiento en medio de sales minerales con un 2% de n-parafinas o queroseno como única fuente de carbono	Tonkova y Gesheva (2007)
	• Biodegradación de ácido tánico	Pepi <i>et al.</i> (2010)
	• Cumplen un rol importante en el biocontrol, por su amplia diversidad de compuestos bioactivos hacia el control de patógenos de plantas.	Canchignia <i>et al.</i> (2015)
	• Utilizada en degradación de lodos petroquímicos ricos en hidrocarburos tanto aromáticos como saturados o alifáticos.	Chirinos <i>et al.</i> (2010)
	• Tiene efecto antagónico frente a los hongos xilófagos causantes del biodeterioro de la madera.	García <i>et al.</i> (2018)
<i>Pseudomonas sp</i>	• Es capaz de solubilizar fuentes de fósforo de baja solubilidad como la roca fosfórica (de gran importancia en la agricultura sostenible), incrementando de manera significativa la biomasa y el desarrollo de las plantas.	Sánchez <i>et al.</i> (2014)
	• Cumplen un rol importante en el biocontrol, por su amplia diversidad de compuestos bioactivos hacia el control de patógenos de plantas.	Canchignia <i>et al.</i> (2015)
<i>Serratia sp</i>	• Tiene gran influencia en la salud de la planta al mejorar la adquisición de nutrientes y la estimulación hormonal.	Berg (2009)

Fuente: Propia

Tabla 15. Aplicaciones biotecnológicas de utilidad agrícola e industrial de aislados de hongos filamentosos y levaduriformes identificados a nivel de especie y/o género, procedentes de la quesera artesanal y los planteles mineros.

Microorganismos	Aplicaciones	Referencias
HONGOS LEVADURIFORMES		
<i>Candida pararugosa</i>	Koumiss: mejora del aroma y la textura del producto con la adición de nutrientes a la salud humana.	Nandy y Srivastava (2018)
<i>Cyberlindnera jadinii</i>	- Reducción <i>in vitro</i> del cromo hexavalente utilizando la cromato reductasa cruda (CChR) de <i>Pichia jadinii</i>. - Biocontrolador: inhibe el crecimiento y la morfogénesis de <i>Candida albicans</i>. - Obtención de proteína 26-KDa a partir de los nucleosidos mitocondriales. - Biocatálisis de 4-hidroxi-2-butanona a (R) -1,3-butanodiol. - Biolixiviación: síntesis de nanopartículas de oro en exposición a ácido cloroáurico (HAuCl₄).	Martorell <i>et al.</i> (2012) Buerth <i>et al.</i> (2016) Miyakawa y Yawata (2007) Yang <i>et al.</i> (2014) Gericke y Pinches (2006)
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	- Producción de carotenoides: uso de desechos agrícolas como fuente de carbono. - Producción de aceite unicelular a partir de hidrolizado de almidón de yuca. - Producción de aceite unicelular a partir de hidrolizados de inulina y extracto de tubérculos de alcachofa de Jerusalén. - Biocontrol de la descomposición del moho gris y azul postcosecha de manzanas y posibles mecanismos de acción. - Biosensor microbiano modificado voltamétrico para la determinación de Cu (II). - Biodegradación: degradación aerobia del nitrobenceno por inmovilización de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> en espuma de poliuretano. - Biodegradación en suelos arcillosos de acetamiprid y el tiacloprid por hidrolisis. - Biocontrolador del moho azul en manzanas causado por <i>penicillium expansum</i>.	Aksu y Tuğba (2005) Li <i>et al.</i> (2010) Zhao <i>et al.</i> (2010) Li <i>et al.</i> (2011) Yüce <i>et al.</i> (2010) Zheng <i>et al.</i> (2009) Dai <i>et al.</i> (2010) Gholamnejad <i>et al.</i> (2010)

Continuación **Tabla 15**

Microorganismos	Aplicaciones	Referencias
	• Producción de xilitol a partir de xilosa, etanol a partir de glucosa, galactosa y manosa, y de arabitol a partir de arabinosa por fermentación.	Bura <i>et al.</i> (2012)
	• Biodegradación completa de los ácidos protocatecúico, vanílico y p-coumárico y tirosol y reducción el 56% y el 44% del ácido gálico y el catecol en aguas residuales de almazaras.	Jarboui <i>et al.</i> (2015)
	• Tratamiento biológico de aguas residuales de un loino de oliva: disminución del DQO, la concentración de compuestos polifenólicos y el color del efluente.	Jarboui <i>et al.</i> (2012)
	• Mejora del proceso de biolixiviación de lodos de curtiembre a través de la elevación de CO₂ disuelto y los niveles de sustancias poliméricas extracelulares en solución.	Wang <i>et al.</i> (2010)
<i>Trichosporon asahii</i>	• Biorremediación: productor de biosurfactante en medio de sales minerales que contiene aceite diésel como fuente de carbono y que se considera un producto eficiente, degradador del gasóleo (95%).	Chandran y Das (2010)
	• Biosíntesis de lipasa utilizada para desarrollar reacciones hidrolíticas deseadas.	Kumar <i>et al.</i> (2009)
	• Biorremediación de aguas residuales del descafeinado en industria de café: la eliminación de cafeína (mediante degradación).	Lakshmi y Das (2012)
	• Producción de lipasa activada por tiol y desarrollo de una formulación de prelavado para eliminar el aceite de la tela sucia a temperatura ambiente.	Kumar <i>et al.</i> (2009)
	• Biorremediación: capacidad para asimilar y degradar los fenilalcanos. Además, los componentes de aceite aromático sustituido con alquilo pueden usarse para la síntesis microbiana de cumarinas.	Awe <i>et al.</i> (2009)
	• Producción de liopasa extracelular menor de 27 kDa para producción eficiente de biodiesel a partir de aceite de coco con una tasa de conversión de 87.6 %.	Kumari y Gupta (2012)
HONGOS FILAMENTOSOS		
<i>Aspergillus hiratsukae</i>	• Hasta el momento de la búsqueda no se encontró ninguna aplicación biotecnológica.	

Continuación **Tabla 15**

Microorganismos	Aplicaciones	Referencias
<i>Penicillium janthinellum</i>	- Producción de enzimas xilanólíticas a partir de desechos orgánicos: La mazorca de maíz y la cáscara de avena fueron los mejores inductores, mientras que el bagazo de caña de azúcar y la cáscara de maíz fueron moderadamente buenos. - Producción de celulasa iónica y líquidas que son capaces de hidrolizar la celulosa en material lignocelulósico como celulosa o vapor explotó bagazo en combinación con salvado de trigo, se estudió en fermentación en estado sólido. - Producción de celulasa para la aplicación en procesos separados de hidrólisis y fermentación y de sacarificación y fermentación simultáneas para la producción de bioetanol a partir de paja de trigo pretratada. - Híper producción de α-amilasa extracelular en fermentación en estado sólido. - Pellets de micelio preparados aplicados como biosorbentes para eliminar tintes de soluciones acuosas. - Biotransformación de imperatorin y producción de metabolitos transformados con actividad anti-osteoporosis. - Preparación de filtrado de cultivo para mejorar el crecimiento y resistencia al estrés de salinidad de las plantas huésped y de Sitiens al producir giberelinas y activar los mecanismos defensivos. - Producción de enzimas celulolíticas a través de diversas secreciones usando como fuente la paja de trigo. - Biosíntesis de nanopartículas de plata (AgNO₃) usando <i>Aspergillus conicus</i>, <i>Penicillium janthinellum</i> y <i>Phomopsis sp.</i> con potencial antimicrobiano. - Biosíntesis de quitosana a partir de un medio <i>Penicillium janthinellum</i> D4 que contiene polvo de pluma de calamar (SPP) y se purificó mediante precipitación con sulfato de amonio y cromatografía de columna combinada. - Biorremediación: degradación de petróleo crudo en los efluentes del río Kaduna por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Penicillium janthinellum</i>. - Biosíntesis de celulasa por mutantes de <i>Penicillium janthinellum</i> utilizando fermentación sumergida como la fermentación en estado sólido y su aplicación en la hidrólisis de Avicel y celulosa. - Bioprotector: mejorar la toxicidad inducida por aluminio (Al) en plantas tolerantes de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>).	Oliveira <i>et al.</i> (2006) Adsul <i>et al.</i> (2009) Rani <i>et al.</i> (2014) Sindhu <i>et al.</i> (2009) Wang <i>et al.</i> (2015) Lv <i>et al.</i> (2013) Khan <i>et al.</i> (2013) Sharma <i>et al.</i> (2015) Bharathidasan y Panneerselvam (2012) Nguyen <i>et al.</i> (2014) Bako <i>et al.</i> (2008) Singhvi <i>et al.</i> (2011) Latif <i>et al.</i> (2015)

Continuación **Tabla 15**

Microorganismos	Aplicaciones	Referencias
<i>Penicillium simplicissimum</i>	Biorremediación: la reducción y la metilación de As (V) se formaron como As (III), MMA y DMA como productos de primaría.	Sua <i>et al.</i> (2012)
	Biosorción endotérmica y espontánea de Cd (II), Zn (II) y Pb (II), en un sistema de lotes.	Fan <i>et al.</i> (2008)
	Biodegradación de polietileno por cultivo líquido con hifas del hongo.	Yamada <i>et al.</i> (2001)
	Biosíntesis de lipasa en la fermentación de estado sólido de la torta de babassu, residuo de la industria petrolera.	Gutarra <i>et al.</i> (2009)
	Biosíntesis: producción de lipasa mediante el diseño factorial y la metodología de superficie de respuesta utilizando harina de soya como sustrato.	Vargas <i>et al.</i> (2008)
	Biolixiviación del medio gastado de una etapa, dos pasos y medio gastado del catalizador gastado, se examinó en cultivos discontinuos con los iones metálicos únicos Ni, Mo, Fe y W.	Amiri <i>et al.</i> (2011)
	Biopromotor: activación directa de los genes relacionados con resistencia sistémica inducida en las plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i>.	Hossain <i>et al.</i> (2007)
	Optimización en la biolixiviación de metales Ni, Mo y Al de un catalizador de hidrocrackeo gastado.	Amiri <i>et al.</i> (2011)
	Biocontrolador: inducción de resistencia sistémica contra el virus del mosaico del pepino en las plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> y tabaco.	Elsharkawy <i>et al.</i> (2012)
	Biosíntesis: concentración intracelular y la excreción de succinato en condiciones aeróbicas y anaeróbicas.	Gallmetzer <i>et al.</i> (2002)
	Biosorción: Inmovilizado dentro de esponja loofa (PSILS) para metales pesado, Pb (II) y Cu (II) de medios acuosos.	Li <i>et al.</i> (2008)
	Biorremediación: de decoloración y desintoxicación de los tintes textiles Reactivo Rojo 198 (RR198), Azul reactivo 214 (RB214), Azul reactivo 21 (RB21) y la mezcla de los tres tintes (MXD).	Bergsten <i>et al.</i> (2009)
	Biosíntesis: utilización de residuos de ricino del proceso de producción de biodiesel como medio de cultivo para el crecimiento de hongos y la producción de lipasa.	Godoy <i>et al.</i> (2011)
	Producción de biomasa y la biodegradación de aguas residuales de la almazara, llevando a cabo una reducción sobresaliente de la demanda química de oxígeno y del contenido fenólico, así como un aumento del pH.	Robles <i>et al.</i> (2000)

Continuación **Tabla 15**

Microorganismos	Aplicaciones	Referencias
<i>Trichoderma sp</i>	- Biosíntesis de celulasa con el uso de orujo de manzana por fermentación en estado sólido. - Biosíntesis: producción de lactasa. - Biosorción: para la eliminación de Orange G de soluciones acuosas de efluentes. - Biocatalizador de la hidrólisis del éter de bencilglicidilo. - Biosíntesis de β-endoxilanasas en fermentación en estado sólido e hidrólisis del xilano de avena espelta por enzimas, acciones en la producción de xilooligosacáridos.	Sun <i>et al.</i> (2010) Seyis y Aksoz (2004) Sivasamy y Sundarabal (2010) Provedel <i>et al.</i> (2011) Chen <i>et al.</i> (2009)

Fuente: Propia

La biotecnología tiene un carácter interdisciplinario y por medio de la aplicación de métodos permite la obtención de productos a partir de materias primas, incidiendo sus aplicaciones sobre alimentos, industria agroalimentaria, medicina, producción industrial, medio ambiente y producción de energía, siendo el uso de microorganismos una constante en la mayoría de las áreas (González, 2011). Actualmente se han realizado diversas investigaciones que se basan en la búsqueda o revisión a cerca de las aplicaciones biotecnológicas de los microorganismos en diversos ámbitos. Aceves y Castañeda (2012), efectuaron una revisión bibliográfica para la producción biotecnológica de lipasas microbianas como una alternativa sostenible para la utilización de residuos agroindustriales. Gutiérrez *et al.* (2010), revisaron diversos estudios realizados acerca de los mecanismos fúngicos de interacción con el cromo y las aplicaciones de dichos mecanismos en el contexto de la biotecnología ambiental, haciendo énfasis en algunas de las direcciones futuras de investigación y desarrollo tecnológico. Pedraza *et al.* (2010), la investigación concentra los temas con aspectos inherentes a las interacciones biológicas que se dan en el suelo y su efecto sobre el crecimiento de las plantas y la conservación del ambiente, además de la importancia de los microorganismos y su utilización biotecnológica. Martínez y García (2012), centraron su trabajo en la revisión sobre el uso de microorganismos inmovilizados para la degradación de contaminantes orgánicos en el suelo.

Dentro del marco de la búsqueda de aplicaciones biotecnológicas en el sector agrícola e industrial (entre otros) que tiene cada uno de los microorganismos identificados, se reportan en las **Tablas 13, 14 y 15** un total de 127 citas de artículos científicos consultados, de los cuales se desprende un amplio desarrollo de bioprocesos que involucran a estos microorganismos, ya sea de una cepa microbiana en particular o de la formación de consorcios microbianos. Entre estos bioprocesos se puede mencionar el desarrollo de biotecnologías en biosorción, biolixiviación, biosíntesis de enzimas, biodegradación, biorremediación, etc.

Una de las aplicaciones más comunes entre la gama de cepas identificadas en este trabajo, es la promoción del crecimiento vegetal y el control de plagas en diversos cultivos o en sus cosechas (Zhao *et al.*, 2012; Kauroulakis *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2010), un resultado que sin duda alguna responde de manera directa al tercer objetivo planteado en esta investigación; se trata del desarrollo de bioprocesos en el sector agrícola. Entre las bacterias identificadas que realizan estas funciones, se destacan *Acinetobacter calcoaceticus*, *Aeromonas hydrophila*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Psychrobacter alimentarius*, *Serratia marcescens* y *Terribacillus saccharophilus* y entre los hongos el *Penicillium janthinellum* y *Penicillium simplicissimum*, el género *Trichoderma sp.*, y las levaduras *Cyberlindenera jadinii* y *Rhodotorula mucilaginosa*.

Entre las utilidades industriales derivadas del banco microbiano identificado, se destaca la producción de lipasas por medio de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* (Jeager y Reetz, 1998), una enzima de gran utilidad en la industria orgánica. Por otra parte, *Exiguobacterium aurantiacum* y *Serratia marcescens* participa en la producción de pigmentos biodegradables que pueden ser usados en la industria textil, cosmética, farmacéutica, etc. (Shatila *et al.*, 2013; Gulani *et al.* 2012). *Bacillus sp.* resulta de gran

utilidad en la producción de proteasas utilizadas en la industria alimentaria (Patel *et al.*, 2005). De las cepas fúngicas filamentosas como: *Penicillium janthinellum*, *Penicillium simplicissimum* y *Trichoderma sp*, se reportan bioprocesos para biosíntesis de enzimas (amilasa, celulasa, lipasa y lactasa) (Rani *et al.* 2014; Sindhu *et al.* 2009; Gutarra *et al.*, 2009; Sun *et al.* 2010), además de la biolixiviación (Amiri *et al.*, 2011). De las levaduriformes (*Cyberlindnera jadinii*, *Rhodotorula mucilaginosa* y *Trichosporon asahii*) se han reportado en la producción de lipasa y la producción de aceite unicelular (Li *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2009), también para la biolixiviación de metales (Wang *et al.* 2010; Gericke y Pinches, 2006).

Por otra parte, se cuenta con varias especies de bacterias (*Acinetobacter calcoaceticus*, *Bacillus marisflavi*, *Exiguobacterium aurantiacum*, *Planococcus maritimus* y *Pseudomonas aeruginosa*) y hongos (*Penicillium janthinellum*, *Penicillium simplicissimum* y *Trichosporon asahii*) que actúan en la biorremediación de ambientes contaminados con petróleo y sus derivados y en la biosorción de metales pesados (Chirinos *et al.*, 2010; Lu *et al.*, 2006; Srivastava y Thakur, 2007). Cabe señalar que esta aportación ambiental es parte de un resultado integrado en un proyecto de bioprospección microbiana de mayor envergadura del cual se dividió el presente trabajo para su mejor desarrollo.

Aceves y Castañeda (2012) reportaron las bacterias *Acinetobacter sp*, *Achromobacter lipolyticum*, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus sphaericus*, *Photobacterium lipolyticum*, *Rhodococcus sp*, *Morexella sp*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas fragi*, *Psychrobacter okhotskensis*, *Serratia marcescens* y *Staphylococcus epidermidis*, los hongos filamentosos *Aspergillus alliaceus*, *Aspergillus candidus*, *Aspergillus carneus*, *Aspergillus fischeri*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus sundarbanii*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus versicolor*, *Penicillium aurantiogriseum*, *Penicillium brevicompactum*, *Penicillium camemberti*, *Penicillium chrysogenum I*, *Penicillium corymbiferum I*, *Penicillium crustosum*, *Penicillium egyptiacum*, *Penicillium expansum* y *Penicillium spiculisporum*, *Rhizopus sp*, *Mucor sp* y *Geotrichum sp* y las levaduras *Trichosporon asahii*, *Candida cylindracea*, *Aureobasidium pullulans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia lipolytica*, *Pseudozyma hubeiensis*, *Debaryomyces occidentalislike* y *Cryptococcus sp*, que son productores de lipasa. El desarrollo del presente trabajo confirmó que algunos de los microorganismos identificados como la bacteria *Serratia marcescens* y la levadura *Trichosporon asahii* podrían ser utilizadas en el desarrollo de bioprocesos para la producción de lipasa y por tanto tienen un amplio potencial en la industria orgánica. En este estudio se han encontrado e identificado otros microorganismos que intervienen en la biosíntesis de lipasa como la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* y el hongo *Penicillium simplicissimum*.

Pedraza *et al.* (2010) reportaron bacterias como promotoras del crecimiento vegetal como *Azospirillum sp*, *Azotobacter chroococcum*, *Herbaspirillum sp*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Azotobacter sp*, *Pseudomonas sp*, *Rhizobium sp* y *Bradyrhizobium sp*; además, reportaron bacterias que incrementan el rendimiento en cultivos de arroz, maíz y trigo como *Azospirillum brasilense* y *Pseudomonas fluorescens*. En el presente estudio se identificaron microorganismos promotores del

crecimiento vegetal como las bacterias *Acinetobacter calcoaceticus*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomona aeruginosa* y *Terribacillus saccharophilus* y los hongos *Penicillium simplicissium* y *Penicillium janthinellum*.

La reducción del Cromo (Cr) es posible por la biosorción, bioacumulación y mecanismos bioquímicos desconocidos hasta la fecha. Gutiérrez *et al.* (2010) mencionan el potencial encontrado en los hongos levaduriformes *Saccharomyces cerevisiae*, *Aureobasidium pullulans*, *Lecythophora sp*, *Candida sp* y *Pichia sp*, y los hongos filamentosos *Aspergillus tubingensis*, *Aspergillus sp*, *Penicillium sp* y *Rhizopus sp*. En este trabajo se determinó que las bacterias *Bacillus cereus*, *Bacillus marisflavi*, *Planococcus maritimus*, *Bacillus sp* y *Acinetobacter sp* y la levadura *Cyberlindnera jadinii* también tienen potencial para tratar el cromo hexavalente.

Finalmente, los trabajos desarrollados en bioprospección microbiana en búsqueda de microorganismos útiles para el desarrollo de bioprocesos aplicables a la industria y la agricultura, aportan un buen número de microorganismos plenamente identificados y que han sido reportados en la literatura científica como útiles para el desarrollo de diversos bioprocesos. Lo anterior, abre las puertas para el desarrollo de diversas investigaciones que podrían contribuir por medio de la biotecnología al desarrollo de agro y la industria nacional.

7.2 Publicaciones generadas de la investigación

A partir del desarrollo de este proyecto monográfico hasta la fecha se publicaron dos artículos científicos, referidos a continuación:

1. BIOPROSPECCIÓN MICROBIANA DIRIGIDA A IDENTIFICAR MICROBIOLÓGICA Y MOLECULARMENTE MICROORGANISMOS DE UTILIDAD AGRÍCOLA E INDUSTRIAL EN NICARAGUA, publicado en el **3er foro de Proyectos De Investigación, Desarrollo, Innovación, Posgrado Y Extensión de la Universidad Nacional de Ingeniería** (Delgado-Silva *et al.*, 2018)
2. LA BIOPROSPECCIÓN EN NICARAGUA: AVANCES EN LA BÚSQUEDA DE APLICACIONES AGRÍCOLAS, INDUSTRIALES Y AMBIENTALES, publicado en la **Revista Científica Nexo** (Páramo-Aguilera *et al.*, 2018).

VII. CONCLUSIONES

La realización del presente trabajo y el análisis de los resultados obtenidos, permite llegar a las siguientes conclusiones:

1. Como producto del proceso de aislamiento, selección y purificación de microorganismos se obtuvo un total de 97 aislados microbianos procedentes de la quesera artesanal y 66 aislados de los planteles mineros, para un total de 163 aislados obtenidos en este proyecto. La cantidad y los tipos de aislados obtenidos, está en relación directa con los tipos de medios de cultivos empleados y de las condiciones generales de trabajo de las que se dispuso para desarrollarlo.
2. Las pruebas morfológicas confirmaron los resultados de identificación alcanzados por medio de la biología molecular en 50 microorganismos. El reconocimiento de las características macro y microscópicas de los cultivos axénicos permitió clasificarlos en teminos de dominios basados en el ADN ribosomal, para definir las condiciones del método genómico aplicado para completar su identificación por vía molecular.
3. Como producto de la aplicación de herramientas microbiológicas y moleculares al presente proyecto cuenta con:
 - Con 15 especies bacterianas diferentes y que están plenamente identificadas, quedando aun por precisar la identificación de las que están identificadas hasta el nivel de género.
 - Con 8 especies fúngicas diferentes y que están plenamente identificadas, quedando aun por precisar la identificación de los que están identificadas hasta el nivel de género.
4. Las especies bacterianas y fúngicas plenamente identificadas pertenecen a:
 - *Acinetobacter calcoaceticus* (1), *Aeromonas hydrophila* (1), *Bacillus cereus* (4), *Bacillus marisflavi* (1), *Enterobacter cloacae* (2), *Escherichia coli* (1), *Exiguobacterium aurantiacum* (1), *Klebsiella pneumoniae* (1), *Planococcus maritimus* (1), *Proteus penneri* (1), *Pseudomonas aeruginosa* (2), *Psychrobacter alimentarius* (1), *Serratia marcescens* (3), *Staphylococcus aureus* (1) y *Terribacillus saccharophilus* (1).
 - *Cybelindnera jadinii* (2), *Rhodotorula mucilaginosa* (1), *Candida pararugosa* (1), *Trichosporon asahii* (1), *Pichia jadinii* (1), *Penicillium janthinellum* (1), *Penicillium simplicissimum* (1) y *Aspergillus hiratsukae* (1).

5. Trabajos científicos previamente desarrollados que han sido documentados en este trabajo, confirman que los aislados obtenidos e identificados en esta investigación coinciden con los obtenidos por los mismos en condiciones y ambientes similares.
6. Los resultados obtenidos de la identificación molecular en la mayoría de los casos, para bacterias confirma su identidad con un 99 % y para hongo confirma su identidad con un 100% en comparación con las secuencias obtenidas del Genbank del NCBI. Lo anterior se traduce en un proceso de identificación de calidad.
7. Las aplicaciones biotecnológicas para los microorganismos identificados en este trabajo que fueron obtenidas de bancos de datos internacionales, para la agricultura y la industria, además del ambiente, sugieren lo siguiente:
 - Para la biopromoción del crecimiento vegetal y la bioprotección de los estrés abióticos y bióticos en diversos cultivos o en sus cosechas, se han documentado bioprocesos con bacterias y hongos como: *Acinetobacter calcoaceticus*, *Enterobacter cloacae*, *Exiguobacterium aurantiacum*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pantoea sp*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Psychrobacter alimentarius*, *Serratia marcescens*, *Terribacillus saccharophilus*, *Penicillium janthinellum*, *Penicillium simplicissimum*, *Cyberlindenera jadinii* y *Rhodotorula mucilaginosa*.
 - Para las industrias de producción de enzimas, pigmentos biodegradables, biolixiviación y producción de aceite se han identificado microorganismos como: *Planococcus maritimus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Bacillus sp*, *Penicillium janthinellum*, *Penicillium simplicissimum*, *Trichoderma sp*, *Rhodotorula mucilaginosa* y *Trichosporon asahii*.
 - Para el desarrollo de sistemas de tratamiento y bioprocesos aplicables a problemas ambientales, se han identificado microorganismos como: *Bacillus cereus*, *Bacillus marisflavi*, *Planococcus maritimus*, *Psychrobacter alimentarius*, *Acinetobacter sp*, *Bacillus sp*, *Enterobacter sp*, *Cyberlindnera jadinii* y *Rhodotorula mucilaginosa*, que son de gran utilidad en el manejo de sistemas contaminados con cromo hexavalente y otros metales pesados.
8. Finalmente, el desarrollo de estos trabajos en bioprospección microbiana en la búsqueda de microorganismos útiles para el desarrollo de bioprocesos aplicables a la agricultura y la industria, aportó un buen número de microorganismos plenamente identificados y que han sido reportados en la literatura científica como útiles para el desarrollo de diversos bioprocesos. Lo anterior, abre las puertas para la adición de diversas investigaciones que podrían contribuir por medio de la biotecnología a la mejora del agro y la industria nacional.

VIII. RECOMENDACIONES

Al llegar al final de este trabajo y habiéndose obtenido una buena cantidad de resultados, nuevas puertas han sido abiertas para la continuidad de esta investigación y por ello surgen las siguientes recomendaciones:

1. El desarrollo de futuros trabajos en materia de bioprospección, deberá considerar la utilización de medios selectivos y mayor número de medios de cultivo (Variedad) que permitan una mayor captura de microorganismos en función de los recursos disponibles y de los sitios considerados para muestrear.
2. El número de aislados con los que se cuenta como producto de estos trabajos, permite recomendar el desarrollo de investigaciones que posibiliten preservar y conservar los microorganismos a largo plazo hasta su aplicación biotecnológica.
3. Formular proyectos para la búsqueda de financiamiento que permitan disponer de los recursos para la terminación de los procesos de identificación molecular de los 113 microorganismos (87 bacterias y 26 hongos filamentosos) que han quedado por identificar en el presente proyecto.
4. Formular proyectos que permitan disponer de los recursos financieros para el desarrollo de las diferentes etapas que conlleva la obtención de un bioproceso y que al final permita aplicar los microorganismos identificados en este trabajo, brindando soluciones biotecnológicas a problemas relacionados con la agricultura, industria y ambiente.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Abd-Elnaby, H., Abou-Elela, G., Ghozlan, H., Hussein, H. and Sabry, S. (2016). Characterization and bioremediation potential of marine *Psychrobacter* species. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 42(2), 193-203. doi: 10.1016/j.ejar.2016.04.003
- Aceves, A. y Castañeda, L. (2012). Producción biotecnológica de lipasas microbianas, una alternativa sostenible para la utilización de residuos agroindustriales. *Vitae*, 19(3), 244-247. ISSN: 0121-4004
- Acuña, J. (2015). *Caracterización por métodos fenotípicos y genéticos de una cepa de Rhodococcus aislada de una red de distribución de agua*. (Tesis doctoral). Universidad Católica de Murcia, España.
- Adsul, M., Terwardkar, A., Varma, A. and Gokhale, D. (2009). Cellulases from *Penicillium janthinellum* mutants: Solid-state production and their stability in ionic liquids. *BioResources*, 4(4), 1670-1681. ISSN: 1930-2126
- Aksu, Z. and Tuğba, A. (2005). Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: Use of agricultural wastes as a carbon source. *Process Biochemistry*, 40(1), 2985-2991. doi: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.01.011>
- Alais, C. (1988). *Ciencia de la leche: Principio de la técnica lechera*. D.F, México: CONTINENTAL, S.A DE C.V. Cap. 10, pp. 326-333. ISBN: 84-291-1815-2
- Álvarez, C., Osorio, N. y Marín, M. (2013). Identificación molecular de microorganismos asociados a la rizosfera de plantas de vainilla en Colombia. *Acta Biológica Colombiana*, 18(2), 293-305. ISSN: 0120-548X
- Amiri, F., Mousavi, S. and Yaghmaei, S. (2011). Enhancement of bioleaching of a spent Ni/Mo hydroprocessing catalyst by *Penicillium simplicissimum*. *Separation and Purification Technology*, 80(3), 566-576. doi: <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2011.06.012>.
- Amiri, F., Yaghmaei, S. and Mousavi, S. (2011). Bioleaching of tungsten-rich spent hydrocracking catalyst using *Penicillium simplicissimum*. *Bioresource Technology*, 102(1), 1567-1573. doi: 10.1016/j.biortech.2010.08.087
- Apella, M.C. y Araujo, P.Z. (2005). Microbiología de agua. Conceptos básicos. En A.M. Blesa y J. Blanco. (Ed), *Tecnologías solares para la desinfección y descontaminación del agua* (pp. 33-50). Buenos Aires, Argentina. Recuperado de: https://www.psa.es/es/projects/solarsafewater/documents/libro/02_Capitulo_02.pdf
- Arias, E. y Piñeros, P. (2008). *Aislamiento e identificación de hongos filamentosos de muestras de suelo de los paramos de Guasca y Cruz verde* (Tesis de grado). Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.

- Awe, S., Mikolasch, A. and Schauer, F. (2009). Formation of coumarines during the degradation of alkyl substituted aromatic oil components by the yeast *Trichosporon asahii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84(5), 965-976. doi: 10.1007/s00253-009-2044-2
- Babalola, O. (2010). Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnology Letters*, 32(11), 1559–1570. doi: 10.1007/s10529-010-0347-0
- Bako, S., Chukwunonso, D. and Adamu, A. (2008). Bio-remediation of refinery effluents by strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Penicillium janthinellum*. *Applied ecology and environmental research*, 6(3): 49-60. ISSN 1589 1623
- Baudalf, S. (2003). Phylogeny for the faint of heart: A tutorial. *Trends in Genetics*, 19(6), 345-351. doi: 10.1016/S0168-9525(03)00112-4
- Berg, G. (2009). Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84(1), 11–18. doi: 10.1007/s00253-009-2092-7
- Bergsten, L., Nishikawa, M., Baptista, D., Magalhães, D., and Silva, M. (2009). Decolorization of different textile dyes by *Penicillium simplicissimum* and toxicity evaluation after fungal treatment. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40(4), 808-817. doi: <https://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822009000400011>
- Bharathidasan, R. and Panneerselvam, A. (2012). Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles using endophytic fungi *Aspergillus concius*, *Penicillium janthinellum* and *Phomopsis* sp. *International journal of pharmaceutical sciences and research*, 3(9), 3163-3169. ISSN: 0975-8232
- Bou, G., Fernández, A., García, C., Sáez, J. y Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(8), 601-608. doi: 10.1016/j.eimc.2011.03.012
- Buerth, C., Tielker, D. and Ernst, J. (2016). *Candida utilis* and *Cyberlindnera (Pichia) jadinii*: yeast relatives with expanding applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(16), 6981-6990. doi: 10.1007/s00253-016-7700-8
- Bura, R., Vajzovic, A. and Doty, S. (2012). Novel endophytic yeast *Rhodotorula mucilaginosa* strain PTD3 I: production of xylitol and ethanol. *Journal and Microbiology Biotechnology*, 39(1), 1003–1011. doi: 10.1007/s10295-012-1109-x
- Burkovski, A. and Krämer, R. (2002). Bacterial amino acid transport proteins: occurrence, functions, and significance for biotechnological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58(3), 265-274. doi: 10.1007/s00253-001-0869-4

- Canchignia, H., Cruz, N., Barrera, A., Morante, J., Canchignia, G. y Peñafiel, M. (2015). Aplicación de Rizobacterias que promueven el crecimiento en plantas (PGPR) del género *Pseudomonas spp* como controladores biológicos de insectos y nemátodos-plagas. *Ciencia y Tecnología*, 8(1), 25-35. ISSN: 1390-4043
- Cardona, C., Marín, M. y Díez, M. (2012). Identificación del agente causal de la pudrición basal del tallo de vainilla en cultivos bajo cobertizos en Colombia. *Revista Mexicana de Micología*, 35(1), 23-34. ISSN: 0187-3180
- Castillo, F., Hernández, F., Gallegos, G., Flores, A., Rodríguez, R., y Aguilar, C. (2015). Efectividad *in vitro* de *Bacillus* y polifenoles de plantas nativas de México sobre *Rhizoctonia-Solani*. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 6(3), 549-562. doi: 10.29312/remexca.v6i3.638
- Castro, G., Martínez, F., Martínez, A. y Ortega, A. (2013). Caracterización de la microbiota nativa del queso Oaxaca tradicional en tres fases de elaboración. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 33(2), 105-109. ISSN: 1317-973X
- Chandran, P. and Das, N. (2010). Biosurfactant production and diesel oil degradation by yeast species *Trichosporon asahii* isolated from petroleum hydrocarbon contaminated soil. *Internacional journal of engineering science and technology*, 2(12), 6942-6953. ISSN: 0975-5462
- Chen, L., Zhang, M., Zhang, D., Chen, X., Sun, C., Zhou, B. and Zhang, Y. (2009). Purification and enzymatic characterization of two b-endoxylanases from *Trichoderma sp.* K9301 and their actions in xylooligosaccharide production. *Bioresource Technology*, 100(1), 5230-5236. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.05.038>
- Chirinos, I., Larreal, M. y Diaz, J. (2010). Biorremediación de lodos petroquímicos mediante el uso de la biota microbiana autóctona en un oxisol del municipio Lagunillas del estado Zulia, Venezuela. *Revista Científica, UDO Agrícola*, 10(1), 133-140. URL: <http://www.bioline.org.br/pdf?cg10018>
- Cotes, A. M., Barrero, L. S., Rodríguez, F., Zuluaga, M. V. y Arévalo, H. (1ª Ed.). (2012). *Bioprospección para el desarrollo del sector agropecuario de Colombia*. Bogotá, (Cundinamarca): CORPOICA. Cap. 1, pp.10. ISBN: 978-958-740-130-1
- Cuervo, J. (2010). *Aislamiento y caracterización de Bacillus spp como fijadores biológicos de nitrógeno y solubilizadores de fosfatos en dos muestras de biofertilizantes comerciales* (Trabajo de Grado). Pontifica Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias Básicas, Bogotá, Colombia.
- Dahiya, N., Tewari, R., Tiwari, R and Hoondal, G. (2005). Production of an antifungal chitinase from *Enterobacter sp.* NRG4 and its application in protoplast production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(8-9), 1611-1616. doi: 10.1007/s11274-005-8343-6

- Dai, Y., Ji, W., Chen, T., Zhang, W., Liu, Z., Ge, F. and Yuan, S. (2010). Metabolism of the Neonicotinoid Insecticides Acetamiprid and Thiacloprid by the Yeast *Rhodotorula mucilaginosa* Strain IM-2. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(1), 2419-2425. doi: 10.1021 / jf903787s
- de la Rosa, M., Mosso, M. y Ullán, C. (2002). El aire: hábitat y medio de transmisión de microorganismos. *Observatorio Medioambiental*, 5(1), 375-402. ISSN: 1139-1987
- de la Rosa, M., Pintado, C. y Rodríguez, C. (2016). Microbiología del agua mineromedicinal del Balneario de Villavieja. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 82(1), 75-86. ISSN: 1697-4271
- Delgado-Silva, H.D., Fonseca-Cruz, E.J. y Páramo-Aguilera, L.A. (2018). Bioprospección microbiana dirigida a identificar microbiológica y molecularmente microorganismos de utilidad agrícola e industrial en Nicaragua. *3er foro de Proyectos De Investigación, Desarrollo, Innovación, Posgrado Y Extensión de la Universidad Nacional de Ingeniería*, 5-13. ISBN: 978-99964-944-5-1
- Desouky, S., El-Gamal, M. and Barghoth, M. (2015). Aerobic Biodegradation of BTX by Halophilic *Planococcus* sp Strain TS1 Isolated from Egypt. *Journal of Advances in Biology & Biotechnology*, 4(4), 1-13. doi: 10.9734/JABB/2015/23640
- Du, L., Jiang, H., Liu, X. and Wang, E. (2007). Biosynthesis of gold nanoparticles assisted by *Escherichia coli* DH5 α and its application on direct electrochemistry of hemoglobin. *Electrochemistry Communications*, 9(5), 1165-1170. doi: 10.1016/j.elecom.2007.01.007
- Elangovan, R., Abhipsa, S., Rohit, B. and otros. (2006). Reduction of Cr (VI) by a *Bacillus* sp. *Biotechnol Lett*, 28(4), 247-252. doi: <https://doi.org/10.1007/s10529-005-5526-z>
- Elsharkawy, M. Shimizu, M., Takahashi, H. and Hyakumachi, M. (2012). Induction of systemic resistance against Cucumber mosaic virus by *Penicillium simplicissimum* GP17-2 in Arabidopsis and tobacco. *Plant Pathology*, 61(1), 964–976. doi: 10.1111/j.1365-3059.2011.02573.x
- Fan, T., Liu, Y., Feng, B., Zeng, G., Yang, C. and Zhou, M. (2008). Biosorption of cadmium (II), zinc (II) and lead (II) by *Penicillium simplicissimum*: Isotherms, kinetics and thermodynamics. *Journal of Hazardous Materials*, 160(1), 655-661. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.03.038>
- Fang, C., Yao, J., Zheng, Y., Jiang, C., Hu, L., Wu, Y. and Shen, D. (2010). Dibutyl phthalate degradation by *Enterobacter* sp. T5 isolated from municipal solid waste in landfill bioreactor. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 64(6), 442-446. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2010.04.010>

- Farha, A., TR, T., Purushothaman, A., Salam, J. and Hatha, A. (2018). Phylogenetic diversity and biotechnological potentials of marine bacteria from continental slope of eastern Arabian Sea. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16(2), 253-258. doi: 10.1016/j.jgeb.2018.06.002
- Fernández, A., García, C., Sáez, J. y Valdezate, S. (2010). Métodos de identificación en el laboratorio de microbiología. En *Procedimientos en Microbiología Clínica*. España: SEIMC. Cap. 37, pp. 3-14. ISBN: 978-84-614-7932-0
- Flores, M. y Roque, E. (2017). *Aislamiento y caracterización microbiana (microbiológica y molecular) en la búsqueda de Bacillus subtilis a partir de bioinsumos comerciales y pruebas de antagonismo frente a hongos fitopatógenos* (Tesis de grado). Universidad Nacional de Ingeniería. Managua, Nicaragua.
- Franciscon, E., Zille, A., Fantinatti, F., Serrano, I., Cavaco, A. and Durrant, L. (2009). Microaerophilic–aerobic sequentialm decolourization/biodegradation of textile azo dyes by a facultative *Klebsiella* sp. strain VN-31. *Process Biochemistry*, 44(4), 446-452. doi: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.12.009>
- Frioni, L. (3ª Ed.). (2005). *Microbiología básica, ambiental y agrícola*. Montevideo, Uruguay: Departamento de Publicaciones de la Facultad de Agronomía, Universidad de la República Oriental del Uruguay. Cap. 1, pp. 11. ISBN: 9974-0-0290-7
- Gallmetzer, M., Meraner, J. and Burgstaller, W. (2002). Succinate synthesis and excretion by *Penicillium simplicissimum* under aerobic and anaerobic conditions. *FEMS Microbiology Letters*, 210(2), 221–225. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11184.x>
- Gao, L., Kong, F., Feng, C., Wang, J., Gao, J., Shen, G. and Zhang, C. (2016). Isolation, Characterization, and Growth Promotion of Phosphate-Solubilizing Bacteria Associated with *Nicotiana Tabacum* (Tobacco). *Polish Journal of Environmental Studies*, 25(3), 993-1003. doi: 10.15244/pjoes/61820
- García, V. (2004). *Introducción a la Microbiología*. Costa Rica: EUNED. Cap. V, pp. 90-109. ISBN: 9977-31-358-0.
- García, V., Benítez, G., Martínez, M. and Velázquez, C. (2018). Wood preservatives and microbial exudates with antagonistic activity against biological agents. *Mexican Journal of Phytopathology*, 36(1), 56-78. ISSN: 2007-8080
- Gericke, M. and Pinches, A. (2006). Microbial Production of Gold Nanoparticles. *Boletín de oro*, 39(1), 22-28. doi: <https://doi.org/10.1007/BF03215529>
- Ghodake, G., Kalme, S., Jadhav, J. and Govindwar, S. (2008). Purification and Partial Characterization of Lignin Peroxidase from *Acinetobacter calcoaceticus* NCIM 2890 and Its Application in Decolorization of Textile Dyes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 152(1), 6-14. doi: 10.1007/s12010-008-8258-4

- Gholamnejad, J., Reza, H. and Sahebani, N. (2010). Biological control of apple blue mold with *Candida membranifaciens* and *Rhodotorula mucilaginosa*. *African Journal of Food Science*, 4(1), 001-007. ISSN: 1996-0794
- Godoy, A. (2013). *Aislamiento e identificación molecular de especies de levaduras No-Saccharomyces presentes en uvas* (Tesis de grado). Universidad de la República de Uruguay. Montevideo, Uruguay
- Godoy, M., Gutarra, M., Castro, A., Machado, O. and Freire, D. (2011). Adding value to a toxic residue from the biodiesel industry: production of two distinct pool of lipases from *Penicillium simplicissimum* in castor bean waste. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38(8), 945-953. doi: 10.1007/s10295-010-0865-8
- Gómez, J. y Huete, J. (2008). Bioprospección de enzimas de restricción en bacterias de suelos y ambientes volcánicos de Nicaragua. *Encuentro*, 40(81), 70-87. doi: <https://doi.org/10.5377/encuentro.v0i81.3628>
- Gómez, L., Valero, N. y Darío, E. (2012). Bacterias halotolerantes/alcalofilas productoras de ácido indolacético (AIA) asociadas a *Arthrospira platensis* (Cyanophyceae). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(2), 81-88. ISSN: 1909-8758
- González, R. (2011). Biotecnología, Historia y Desarrollo: Situación Actual en Nicaragua. *II CONGRESO MULTIDISCIPLINARIO E INTERNACIONAL DE AGROBIOTECNOLOGÍA*. Conferencia llevada a cabo en Nicaragua.
- Guerrero, V., Trevizo, M., Gardea, A., Figueroa, C., Romo, A., Blanco, A. y Curry, E. (2004). Identificación de Levaduras Epifitas Obtenidas de Manzana [*Malus sylvestris* (L.) Mill. var. *domestica* (Borkh.) Mansf.] para Control Biológico Poscosecha. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 22(2), 223-230. ISSN: 0185-3309
- Gulani, C., Bhattacharya, S. and Das, A. (2012). Assessment of process parameters influencing the enhanced production of prodigiosin from *Serratia marcescens* and evaluation of its antimicrobial, antioxidant and dyeing potentials. *Malaysian Journal of Microbiology*, 8(2), 116-122. doi: 10.21161/mjm.03612
- Gutarra, M., Godoy, M., Maugeri, F., Rodrigues, M., Freire, D. and Castilho, L. (2009). Production of an acidic and thermostable lipase of the mesophilic fungus *Penicillium simplicissimum* by solid-state fermentation. *Bioresource Technology*, 100(1), 5249-5254. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.08.050>
- Gutiérrez, J., Espino, A., Coreño, A., Acevedo, F., Reyna, G., Fernández, F., Tomasini, A., Wrobel, K. y Wrobel, K. (2010). Mecanismos de interacción con cromo y aplicaciones biotecnológicas en hongos. *Revista latinoamericana de Biotecnología Ambiental Algal*, 1(1), 47-63. ISSN: 2007-2570

- Hasanuzzaman, M., Umadhay-Briones, K., Zsiros, S., Morita, N., Nodasaka, Y., Yumoto, I. and Okuyama, H. (2004). Isolation, Identification, and Characterization of a Novel, Oil-Degrading Bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* T1. *Current Microbiology*, 49(2), 108-114. doi: 10.1007/s00284-004-4267-x
- Hernández, D. y Loaiza, S. (2014). *Selección de un método para la conservación y preservación de Actinomicetos aislados del suelo del jardín botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira*. (Trabajo de grado). Universidad Tecnológica de Pereira, Colombia.
- Hossain, M., Sultana, F., Kubota, M., Koyama, H. and Hyakumachi, M. (2007). The Plant Growth-Promoting Fungus *Penicillium simplicissimum* GP17-2 Induces Resistance in *Arabidopsis thaliana* by Activation of Multiple Defense Signals. *Plant and Cell Physiology*, 48(12), 1724-1736. doi: <https://doi.org/10.1093/pcp/pcm144>
- Huete-Perez, J. A. (2008). Biotecnología para el desarrollo de naciones pequeñas. *Revista Encuentro*, Año XL, (79), 89-95. doi: <https://doi.org/10.5377/encuentro.v0i79.3652>
- Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria. (2013). Estado, Prioridades y necesidades para el manejo sostenible del suelo en Nicaragua. Managua, Nicaragua.
- Jaeger, K-E., Schneidinger, B., Rosenau, F., Werner, M., Lang, D., Dijkstra, B., Schimossek, K., Zonta, A. and Reetz, M. (1997). Bacterial lipases for biotechnological applications. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 3(1-4), 3–12. doi: 10.1016/S1381-1177(96)00039-2
- Jarboui, R., Baati, H., Fetoui, F., Gargouri, A., Gharsallah, N. and Ammar, E. (2015). Yeast performance in wastewater treatment: case study of *Rhodotorula mucilaginosa*. *Environmental Technology*, 33(8), 951-960. doi: 10.1080/09593330.2011.603753
- Jarboui, R., Magdich, S., Jarboui, R. Gargouri, A., Gharsallah, N. and Ammar, E. (2012). *Aspergillus niger* P6 and *Rhodotorula mucilaginosa* CH4 used for olive mill wastewater (OMW) biological treatment in single pure and successive cultures. *Environmental Technology*, 34(5), 629-636. doi: 10.1080/09593330.2012.710404
- Jeager, K-E and Reetz, M. T. (1998). Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 16(9), 396-403. doi: 10.1016/S0167-7799(98)01195-0
- Kang, S-M., Latif, A., Hamayun, M., Khan, Z., Kim, Y-H., Joo, G-J. and Lee, I-J. (2012). *Acinetobacter calcoaceticus* ameliorated plant growth and influenced gibberellins and functional biochemicals. *Pack. J. Bot*, 44(1), 365-372. doi: <https://www.researchgate.net/publication/230845584>

- Kavroulakis, N., Ntougias, K., Besi, M., Katsou, P., Damaskinou, A., Constantinos, E., Zervakis, G. and Papadopoulou, K. (2010). Antagonistic bacteria of composted agro-industrial residues exhibit antibiosis against soil-borne fungal plant pathogens and protection of tomato plants from *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*. *Plant and Soil*, 333(1-2), 233-247. doi: 10.1007/s11104-010-0338-x
- Khan, A., Waqas, M., Khan, A., Hussain, J., Kang, S., Gilani, S., Hamayun, M., Shin, J., Kamran, M., Al-Harrasi, A., Yun, B., Adnan, M. and Lee, I. (2013). Fungal endophyte *Penicillium janthinellum* LK5 improves growth of ABA-deficient tomato under salinity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(11), 2133-2144. doi: 10.1007/s11274-013-1378-1
- Koma, D., Hasumi, F., Yamamoto, E., Ohta, T., Chung, S. and Kubo, M. (2001). Biodegradation of long-chain n-paraffins from waste oil of car engine by *Acinetobacter* sp. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 91(1), 94-96. doi: [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(01\)80120-1](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(01)80120-1).
- Korman, T. P. and Bowie, J. U. (2012). Crystal Structure of *Proteus mirabilis* Lipase, a Novel Lipase from the *Proteus*/*Psychrophilic* Subfamily of Lipase Family I.1. *PLOS ONE*, 7(12), e52890. doi: 10.1371/journal.pone.0052890
- Kumar, S., Arora, N., Bhatnagar, R. and Gupta, R. (2009). Kinetic modulation of *Trichosporon asahii* MSR 54 lipase in presence of organic solvents: Altered fatty acid specificity and reversal of enantio selectivity during hydrolytic reactions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 59(1-3), 41-46. doi: 10.1016/j.molcatb.2008.12.013
- Kumar, S., Kumar, L., Sahai, V. and Gupta, R. (2009). A thiol-activated lipase from *Trichosporon asahii* MSR 54: detergent compatibility and presoak formulation for oil removal from soiled cloth at ambient temperature. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36(3), 427-432. doi: 10.1007/s10295-008-0513-8
- Kumari, A. and Gupta, R. (2012). Purification and biochemical characterization of a novel magnesium dependent lipase from *Trichosporon asahii* MRS 54 and its application in biodiesel production. *Asian journal of biotechnology*, 4(2), 70-82. doi: 10.3923/ajbkr.2012.70.82
- Lafuente, D., Barboza, J., Salcedo, R., Abraham, R., Valadez, J., Quistián, D. y de la Fuente, N. (2016). Identificación molecular de hongos fitopatógenos de fresa por PCR (ITS y EF-1 α) y susceptibilidad a bacteriocinas de *Bacillus thuringiensis*. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 1(1), 417-422. ISSN: 2448-7503
- Lakshmi, V. and Das, N. (2012). Removal of caffeine from industrial wastewater using *Trichosporon asahii*. *Journal of Environmental Biology*, 34(1), 701-708. ISSN: 0254-8704

- Lara, C., Esquivel, L. y Negrete, J. (2011). Bacterias nativas solubilizadores de fosfato para incrementar los cultivos en el departamento de córdoba-colombia. *Biotecnología en el sector agropecuario e industrial*, 9(2), 114-120. URL: www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v9n2/v9n2a13.pdf
- Lara, C., Sanes, S. y Oviedo, L. (2013). Impacto de bacterias nativas solubilizadoras de fosfato en el crecimiento y desarrollo de plantas de rábano (*Raphanus sativus* L.). *Biotecnología Aplicada*, 30(4), 271-275. URL: <https://elfosscientiae.cigb.edu.cu/PDFs/Biotecnol%20Apl/2013/30/4/BA003004OL271-275.pdf>.
- Latif, A., Waqas, M., Hussain, J., Al-Harrasi, A., Hamayund, M. and Lee, I. (2015). Phytohormones enabled endophytic fungal symbiosis improve aluminum phytoextraction in tolerant *Solanum lycopersicum*: An examples of *Penicillium janthinellum* LK5 and comparison with exogenous GA3. *Journal of Hazardous Materials*, 295(1), 70-78. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.04.008>
- Li, M., Liu, G., Chi, Z. and Chi, Z. (2010). Single cell oil production from hydrolysate of cassava starch by marine-derived yeast *Rhodotorula mucilaginosa* TJY15a. *Biomass and Bioenergy*, 34(1), 101-107. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2009.10.005>
- Li, R., Zhang, H., Liu, W. and Zheng, X. (2011). Biocontrol of postharvest gray and blue mold decay of apples with *Rhodotorula mucilaginosa* and posible mechanisms of action. *International Journal of Food Microbiology*, 146(1), 151-156. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.015>
- Li, X., Liao, D., Xu, X., Yang, Q., Zeng, G., Zheng, W. and Guo, L. (2008). Kinetic studies for the biosorption of lead and copper ions by *Penicillium simplicissimum* immobilized within loofa sponge. *Journal of Hazardous Materials*, 159(1), 610-615. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.02.068>.
- Lim, H., Syed, M and Shukor, M. (2011). Reduction of molybdate to molybdenum blue by *Klebsiella* sp. strain hkeem. *Jornual Basic Microbiology*, 52(1), 296-305. doi: 10.1002/jobm.201100121
- Liu, Y., Zhang, A. and Wang, X. (2009). Biodegradation of phenol by using free and immobilized cells of *Acinetobacter* sp. XA05 and *Sphingomonas* sp. FG03. *Biochemical Engineering Journal*, 44(1), 187-192. doi: 10.1016/j.bej.2008.12.001
- López, M., Suarez, F. y Moreno, J. (2018). Los microorganismos como elementos clave de la bioeconomía. *Mediterráneo Económico*, 31(1), 291-308. ISSN: 1698-3726
- López, W., Ramírez, M., Mambuscay, L. y Osorio, E. (2010). Diversidad de levaduras asociadas a chichas tradicionales de Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 12(2), 176-186. ISSN: 1909-8758

- López-Jácome, L., Hernández-Duran, M., Colín-Castro, C., Ortega-Peña, S., Cerón-González, G. y Franco-Cendejas, R. (2014). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Investigación en Discapacidad Medigraphic*, 3(1), 10-18. URL:<http://medigraphic.com/rid>
- Lu, W., Shi, J., Wang, C. and Chang, J. (2006). Biosorption of lead, copper and cadmium by an indigenous isolate *Enterobacter* sp. J1 possessing high heavy-metal resistance. *Journal of Hazardous Materials*, 134(1-3), 80-86. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2005.10.036>.
- Lv, X., Liu, D., Hou, J., Dong, P., Zhan, L., Wang, L., Deng, S., Wang, C., Yao, J., Shu, X., Liu, K. and Ma, X. (2013). Biotransformation of imperatorin by *Penicillium janthinellum*. Anti-osteoporosis activities of its metabolites. *Food Chemistry*, 138(1), 2260–2266. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.138>
- Madigan, M., Martinko, J., & Thomas, B. (2006). Brock biology of microorganisms (11th ed.). New Jersey: Upper Saddle River.
- Maier, J., Kandelbauer, A., Erlacher, A., Cavaco, A. and Guñbitz, M. (2004). A New Alkali-Thermostable Azoreductase from *Bacillus* sp. Strain SF. *Applied and environmental microbiology*, 70(2), 837–844. doi: 10.1128/AEM.70.2.837–844.2004
- Malarkodi, C., Rajeshkumar, S., Vanaja, M., Paulkumar, K., Gnanajobitha, G. and Annadurai, G. (2013). Eco-friendly synthesis and characterization of gold nanoparticles using *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Nanostructure in Chemistry*, 3(1). doi: 10.1186/2193-8865-3-30
- Marín, M., Pedregosa, A., Ríos, S., Ortiz, M. and Laborda, F. (1995). Biodegradation of diesel and heating oil by *Acinetobacter calcoaceticus* MM5: its possible applications on bioremediation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 35(1-3), 269–285. doi: 10.1016/0964-8305(95)00067-f
- Martínez, M. y García, M. (2012). Revisión: aplicaciones ambientales de microorganismos inmovilizados. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 11(1), 55-73. ISSN: 2395-8472
- Martorell, M.M., Fernández, P.M., Fariña, J.I. and Figueroa, L.I. (2012). Cr (VI) reduction by cell-free extracts of *Pichia jadinii* and *Pichia anomala* isolated from textile-dye factory effluents. *International Biodeterioration y Biodegradation*, 71(1), 80-85. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.04.007>
- Melgarejo, L. M. (2003). Bioprospección: Plan nacional y aproximación al estado actual en Colombia. *Acta Biológica Colombiana*, 8(2). 73-86. ISSN: 0120-548X
- Méndez, J., Flores, M. y Páramo, L. (2017). Aislamiento e identificación de *Bacillus subtilis* y evaluación del antagonismo *in vitro* frente hongos fitopatógenos. *Nexo*, 30(2), 96-110. doi: <http://dx.doi.org/10.5377/nexo.v30i2.5530>

- Mendoza, A. y Guerrero, A. (2015). Biodegradación de petróleo diesel-2 en agua de mar por *Pseudomonas aeruginosa* en un biorreactor aireado y agitado. *SCIENDO* 18(1), 23-37. ISSN: 2617-3735
- Mendoza, M. (2005). Importancia de la identificación de levaduras. Importancia de la identificación de levaduras. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 25(1), 103-117. ISSN: 1315-2556
- Mendoza-Avalos, A. y Guerrero-Padilla, A. (2015). Biodegradación de Petróleo Diesel-2 en agua de mar por *Pseudomonas aeruginosa* en un biorreactor aireado y agitado. *SCIENDO*, 18(1). 23-37.
- Meneses, C., Rozo, L. y Franco, J. (2011). Tecnologías bioinformáticas para el análisis de secuencias de ADN. *Scientia et Technica*, 16(49), 116-121. ISSN: 0122-1701
- Mier, T., Toriello, C. y Ulloa, M. (2002). *Hongos microscópicos saprobios y parásitos: Métodos de laboratorio*. México, D.F: UAM, Unidad Xochimilco, División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Cap. 2, pp.19. ISBN: 970-654-609-X
- Ministerio del Ambiente y de los Recursos Naturales. (2001). Recursos genéticos y biotecnología en Nicaragua. Managua, Nicaragua.
- Ministerio del Ambiente y de los Recursos Naturales. (2014). V Informe Nacional de Biodiversidad. Managua, Nicaragua.
- Mishra, S. and Doble, M. (2008). Novel chromium tolerant microorganisms: Isolation, characterization and their biosorption capacity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71(3), 874-879. doi: 10.1016/j.ecoenv.2007.12.017
- Miyakawa, I. and Yawata, K. (2007). Purification of an Abf2p-like protein from mitochondrial nucleoids of yeast *Pichia jadinii* and its role in the packaging of mitochondrial DNA. *Antonie van Leeuwenhoek*, 91(1), 197-207. doi: <https://doi.org/10.1007/s10482-006-9105-7>
- Mohanty, G. and Mukherji, S. (2008). Biodegradation rate of diesel range n-alkanes by bacterial cultures *Exiguobacterium aurantiacum* and *Burkholderia cepacia*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 61(3), 240-250. doi: 10.1016/j.ibiod.2007.06.011
- Monroy-Dosta, M., Lara-Andrade, R., Castro-Mejía, J., Castro-Mejía, G. y Coelho-Emerenciano, M. (2013). Composición y abundancia de comunidades microbianas asociadas al biofloc en un cultivo de tilapia. *Revista de Biología Marina y Oceanográfica*, 48(3), 511-520. doi: 10.4067/S0718-19572013000300009
- Montaño, N.M., Sandoval, A.L., Camargo, S.L. y Sánchez, J.M. (2010). Los microorganismos: pequeños gigantes. *Elementos*, 77(17), 15-23. ISSN: 0187-9073

- Moreno, J. y Albarracín, V. (2012). Aislamiento, cultivo e identificación de microorganismos ambientales a partir de muestras naturales. *Reduca (Biología). Serie Microbiología*, 5(5), 79-93. ISSN: 1989-3620
- Moreno, L. y Galvis, F. (2013). Potencial biofertilizante de bacterias diazótrofes aisladas de muestras de suelo rizosférico. *Pastos y Forrajes*, 36(1), 33-37. ISSN: 0864-0394
- Nadaf, N. and Kanase, S. (2016). Biosynthesis of gold nanoparticles by *Bacillus marisflavi* and its potential in catalytic dye degradation. *Arabian Journal of Chemistry*. doi: 10.1016/j.arabjc.2016.09.020
- Nandy, S.K. and Srivastava, R.K. (2018). A review on sustainable yeast biotechnological processes and applications. *Microbiological Research*, 207(1), 83-90. doi: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.11.013>
- Naveed, M., Mitter, B., Reichenauer, T., Wieczorek, K. and Sessitsch, A. (2014). Increased drought stress resilience of maize through endophytic colonization by *Burkholderia phytofirmans* PsJN and *Enterobacter* sp. FD17. *Environmental and Experimental Botany*, 97(1), 30-39. doi: <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2013.09.014>.
- Nguyen, A., Huang, C., Liang, T., Nguyen, V., Pan, P. and Wang, S. (2014). Production and purification of a fungal chitosanase and chitooligomers from *Penicillium janthinellum* D4 and discovery of the enzyme activators. *Carbohydrate Polymers*, 108(1), 331-337. doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.02.053>.
- Nurul-Adela, B., Nasrin, A-B. and Loh, S-K. (2016). Palm oil mill effluent as a low-cost substrate for bioflocculant production by *Bacillus marisflavi* NA8. *Bioresources and Bioprocessing*, 3(1), 1-8. doi: 10.1186/s40643-016-0096-6
- Oliart, R., Manresa, A. y Sánchez, M. (2016). Utilización de microorganismos de ambientes extremos y sus productos en el desarrollo biotecnológico. *CienciaUAT*, 11(1), 79-90. ISSN: 2007-7521
- Oliveira, L., Porto, A. and Tambourgi, E. (2006). Production of xylanase and protease by *Penicillium janthinellum* CRC 87M-115 from different agricultural wastes. *Bioresource Technology*, 97(1), 862-867. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.04.017>
- Østgaard, K., Knutsen, S., Dyrset, N. and Aasen, I. (1993). Production and characterization of guluronate lyase from *Klebsiella pneumoniae* for applications in seaweed biotechnology. *Enzyme and Microbial Technology*, 15(9), 756-763. doi: 10.1016/0141-0229(93)90006-n
- Ozdemir, G., Ceyhan, N., Ozturk, T., Akirmak, F. and Cosar, T. (2004). Biosorption of chromium (VI), cadmium (II) and copper (II) by *Pantoea* sp. TEM18. *Chemical Engineering Journal*, 102(3), 249-253. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2004.01.032>

- Pacheco, J. y Cabrera, A. (2011). Cuerpos de aguas subterráneas. En F, Bautista. (2ª Ed.), *TÉCNICAS DE MUESTREO PARA MANEJADORES DE RECURSOS NATURALES*. DF, México: Universidad Nacional Autónoma de México. Cap. 2, pp. 76. ISBN: 978-607-02-2127-9
- Páramo, L., Ortega, B. and Narváez, J. (2012). Culturable fungi associated with urban stone surfaces in Mexico City. *Electronic Journal of Biotechnology*, 15(4). doi: 10.2225/vol15-issue4-fulltext-6
- Páramo-Aguilera, L. (2012). *Caracterización de comunidades microbianas con potencial biotecnológico para la prevención del deterioro estructural* (Tesis doctoral). Instituto Politécnico Nacional, Centro de Biotecnología Genómica, Reynosa, Tamaulipas.
- Páramo-Aguilera, L., Fonseca-Cruz, E., Delgado-Silva, H., Ríos-Guevara, C. y Cabistán-calderón, K. (2018). La bioprospección en Nicaragua: avances en la búsqueda de aplicaciones agrícolas, industriales y ambientales. *Nexo Revista Científica*, 31(2), 89-103. ISSN: E1995-9516
- Páramo-Aguilera, L., Narváez-Zapata, J. y De la Cruz, E. (2011). Aislamiento e identificación de microorganismos en biopelículas provenientes del Castillo de Chapultepec, Ciudad de México. *Nexo Revista Científica*, 24(2), 1-9. ISSN: L1818-6742
- Patel, R., Dodia, M. and Singh, S. (2005). Extracellular alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus* sp.: Production and optimization. *Process Biochemistry*, 40(1), 3569-3575. doi: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.03.049>
- Pedraza, R., Teixeira, K., Fernández, A., García, I., Baca, B. y Azcón, R. (2010). Microorganismos que mejoran el crecimiento de las plantas y la calidad de los suelos. Revisión. *Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 11(2), 155-164. doi: https://doi.org/10.21930/rcta.vol11_num2_art:206
- Pepi, M., Lampariello, L., Altieri, R., Esposito, A., Perra, G., Renzi, M. and Focardi, S. E. (2010). Tannic acid degradation by bacterial strains *Serratia spp.* and *Pantoea sp.* isolated from olive mill waste mixtures. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 64(1), 73-80. doi: 10.1016/j.ibiod.2009.10.009
- Piñero, J. (2013). Importancia biotecnológica de la biodiversidad. Los nuevos cazadores de microbios. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 4(2), 284-317. ISSN: 2218-4384
- Pirog, T., Antonyuk, S., Karpenko, Y. and Shevchuk, T. (2009). The Influence of Conditions of *Acinetobacter calcoaceticus* K-4 Strain Cultivation on Surface-active Substances Synthesis. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 45(3), 272-278. doi: 10.1134/S0003683809030065
- Porres, N. y Ruiz, E. (2018). *Microbiología clínica*. Madrid, España. Paraninfo. Cap. 4, pp.89. ISBN: 978-84-283-4026-7

- Prats, G. (2005). *Microbiología clínica*. Buenos aires, Argentina: Médica Panamericana. Cap. 5, pp. 94-97. ISBN: 978-84-7903-4
- Provedel, M., Mouad, A., Boschini, L., Regali, M., Durães, L. and Meleiro, A. (2011). Marine Fungi *Aspergillus sydowii* and *Trichoderma* sp. Catalyze the Hydrolysis of Benzyl Glycidyl Ether. *Mar Biotechnol*, 13(1), 314-320. doi: 10.1007/s10126-010-9302-2
- Pugazhenthiran, N., Anandan, S., Kathiravan, G., Udaya, N., Crawford, S. and Ashokkumar, M. (2009). Microbial synthesis of silver nanoparticles by *Bacillus* sp. *Journal of Nanoparticle Research*, 11(7), 1811-1815. doi: 10.1007/s11051-009-9621-2
- Ramírez, A. y Benítez, N. (2013). Tolerancia y reducción de cromo (VI) por *Bacillus cereus* b₁, aislado de aguas residuales de una curtiembre. *Revistas de Ciencias*, 17(2), 51-63. doi: <https://doi.org/10.25100/rc.v17i2.486>
- Ramírez, L., Guerra, S. y Reinoso, G. (2016). Evaluación *in vitro* de la capacidad bacteriana para remover plomo en aguas residuales sintéticas. *FIGEMPA: Investigación y Desarrollo* 1(6), 107-114. ISSN:1390-7042
- Rani, R., Kuma, J., Saini, R., Adsul, M., Mathur, A., Gupta, R. and Kumar, D. (2014). Bioethanol production from wheat straw via enzymatic route employing *Penicillium janthinellum* cellulases. *Bioresource Technology*, 16(1), 490–495. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.07.011>
- Rendueles, M. y Díaz, M. (2014). Biotecnología industrial. *Arbor*, 190 (768), a155. doi: <http://dx.doi.org/10.3989/arbor.2014.768n4009>
- Robles, A., Lucas, R., Alvarez, G. and Antonio Gálvez, A. (2000). Biomass production and detoxification of wastewaters from the olive oil industry by strains of *Penicillium* isolated from wastewater disposal ponds. *Bioresource Technology*, 74(1), 217-221. doi: [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00022-5](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00022-5).
- Rodicio, M. y Mendoza, M. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22(4), 238-245. doi: 10.1157/13059055.
- Rodríguez, C. (2013). *Evaluación de microorganismos promotores de crecimiento vegetal en Tomate (Solanum lycopersicum) variedad Santa Clara, aislados de residuos Ligno Celulósicos de Higuierilla (Ricinus communis)*. (Trabajo de grado). Universidad Católica de Manizales, Colombia.
- Rojas, A. (2011). Manual de Microbiología: *Conceptos y Prácticas de Microbiología General*. UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA SEDE PALMIRA. Práctica 5, pp. 49-51.
- Rosselló, R. (2005). El concepto de especie en Procariotas. *Ecosistemas*, 14(2) ,11-16. ISSN: 1697-2473

- Ruiz, A. (2014). *Producción de lipasas de interés ambiental por microorganismos aislados a partir de material vegetal sometido a compostaje* (Trabajo de grado). Escuela Politécnica Superior y Facultad de Ciencias Experimentales, Universidad de Almería, España.
- Salomon, M., Purpora, R., Bottini, A. and Piccoli, P. (2016). Rhizosphere associated bacteria trigger accumulation of terpenes in leaves of *Vitis vinifera* L. cv. Malbec that protect cells against reactive oxygen species. *Plant Physiology and Biochemistry*, 106(1). 295-304. doi: 10.1016/j.plaphy.2016.05.007
- Samaniego, J. y Chew, Y. (2007). Diversidad de géneros de hongos del suelo en tres campos con diferente condición agrícola en La Laguna, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 78(1), 383-390. doi: <http://dx.doi.org/10.22201/ib.20078706e.2007.002.407>
- Sánchez, D., García, A., Romero, F. y Bonilla, R. (2014). Efecto de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal solubilizadoras de fosfato en *Lactuca sativa* cultivar White Boston. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 16(2), 122-128. doi: 10.15446/rev.colomb.biote.v16n2.41077
- Santambrosio, E. y Ortega, M. (2009). CÁTEDRA DE BIOTECNOLOGÍA. *Siembra y recuento de microorganismos*. Santa fe, Argentina: DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA de la Facultad Regional Rosario, Universidad Tecnológica Nacional de la República Argentina.
- Schoebitz, M. (2006). *Aislamiento y caracterización de bacterias promotoras de crecimiento vegetal de la rizósfera de Lolium perenne L. de suelo volcánico (modelo género Azospirillum spp.)* (Tesis de grado). Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile.
- Seyis, I. and Aksoz, N. (2004). Production of Lactase by *Trichoderma* sp. *Food Technol. Biotechnol*, 42(2), 121-124. ISSN: 1330-9862
- Sharma, B., Agrawal, R., Singhanian, R., Satlewal, A., Mathur, A., Tuli, D. and Adsul, M. (2015). Untreated wheat straw: Potential source for diverse cellulolytic enzyme secretion by *Penicillium janthinellum* EMS-UV-8 mutant. *Bioresource Technology*, 196(1), 518-524. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.012>
- Shatila, F., Yusef, H. and Holail, H. (2013). Pigment production by *Exiguobacterium aurantiacum* FH, a novel Lebanese strain. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 2(12), 176-191. ISSN: 2319-7706
- Shrishailnath, S., Kulkarni, G., Yaligara, V., Kyoung, L. and Karegoudar, T. (2010). Purification and Physiochemical Characterization of Melanin Pigment from *Klebsiella* sp. GSK. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(11), 1513-1520. doi: 10.4014/jmb.1002.02006
- Sierra, I., Romero, M. y Orduz, S. (2012). Determinación de la actividad antimicrobiana e insecticida de extractos producidos por bacterias aisladas de suelo. *Actualidades Biológicas*, 34(96), 5-19. ISSN: 0304-3584

- Sindhu, R., Suprabha, G. and Shashidhar, S. (2009). Optimization of process parameters for the production of α - amylase from *Penicillium janthinellum* (NCIM 4960) under solid state fermentation. *African Journal of Microbiology Research*, 3(9), 498-503. ISSN: 1996-0808
- Singh, J., Batra, N y Sobti, R. (2001). Serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp. SSR1. *Process Biochemistry*, 36(1), 781-785. doi: [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00275-2](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00275-2).
- Singh, R., Jha, P. and Jha, P. (2015). The plant-growth-promoting bacterium *Klebsiella* sp. SBP-8 confers induced systemic tolerance in wheat (*Triticum aestivum*) under salt stress. *Journal of Plant Physiology*, 184(1), 57-67. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2015.07.002>
- Singhvi, M., Adsul, M. and Gokhale, D. (2011). Comparative production of cellulases by mutants of *Penicillium janthinellum* NCIM 1171 and its application in hydrolysis of Avicel and cellulose. *Bioresource Technology*, 102(1), 6569-6572. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.01.014>
- Sinha, A., and Khare, S. (2011). Mercury bioaccumulation and simultaneous nanoparticle synthesis by *Enterobacter* sp. Cells. *Bioresource Technology*, 102(5), 4281-4284. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.12.040>
- Sivasamy, A. and Sundarabal, N. (2010). Biosorption of an Azo Dye by *Aspergillus niger* and *Trichoderma* sp. Fungal Biomasses. *Curr Microbiol*, 62(1), 351-357. doi: 10.1007/s00284-010-9713-3
- Solano, C. (2006). Microbiología de Alimentos: *Prácticas de microbiología de alimentos*. Navarra, España: Instituto de Agrobiotecnología y Recursos Naturales, Universidad Pública de Navarra.
- Srivastava, S. and Thakur, I. (2007). Evaluation of biosorption potency of *Acinetobacter* sp. for removal of hexavalent chromium from tannery effluent. *Biodegradation*, 18(1), 637-646. doi: 10.1007/s10532-006-9096-0
- Strahsburger, E., Zapata, F., Pedroso, I., Fuentes, D., Tapia, P., Ponce, R. and Valdes, J. (2017). Draft genome sequence of *Exiguobacterium aurantiacum* strain PN47 isolate from saline ponds, known as “Salar del Huasco”, located in the Altiplano in the North of Chile. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49(1), 7-9. doi: 10.1016/j.bjm.2017.03.011
- Sua, S., Zenga, X., Li, L., Duana, R., Bai, L., Li, A., Wang, J., and Jiang, S. (2012). Arsenate reduction and methylation in the cells of *Trichoderma asperellum* SM-12F1, *Penicillium janthinellum* SM-12F4, and *Fusarium oxysporum* CZ-8F1 investigated with X-ray absorption near edge structure. *Journal of Hazardous Materials*, 243(1), 364–367. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.09.061>
- Subramanian, S., Sam, S. and Jayaraman, G. (2012). Hexavalent chromium reduction by metal resistant and halotolerant *Planococcus maritimus* VITP21. *African Journal of Microbiology Research*, 6(47), 7339-7349. doi: 10.5897/AJMR12.143

- Sun, H., Ge, X., Hao, Z. and Peng, M. (2010). Cellulase production by *Trichoderma* sp. on apple pomace under solid state fermentation. *African Journal of Biotechnology*, 9(2), 163-166. ISSN: 1684-5315
- Suntornsuk, W. and Suntornsuk, L. (2003). Feather degradation by *Bacillus* sp. FK 46 in submerged cultivation. *Bioresource Technology*, 86(3), 239-243. doi: [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(02\)00177-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00177-3)
- Tanyildizi, M., Özer, D. and Elibol, M. (2005). Optimization of α -amylase production by *Bacillus* sp. using response surface methodology. *Process Biochemistry*, 40(1), 2291-2296. doi: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.06.018>.
- Terry, E., Ruiz, J. y Tejeda, T. (2010). Efecto de un bioproducto a base de *Pseudomona aeruginosa* en el cultivo del tomate (*Solanum lycopersicum* Mill). *Revista Colombiana Biotecnológica*, 12(1), 32-38. ISSN: 1909-8758
- Throne, M., Wentzel, A., Ellingsen, T., Kotlar, H. and Zotchev, S. (2007). Identification of Novel Genes Involved in Long-Chain n-Alkane Degradation by *Acinetobacter* sp. Strain DSM 17874. *Applied and environmental microbiology*, 73(10) 3327-3332. doi: 10.1128 / AEM.00064-07
- Tindall, B., Busse, H., Ludwig, W., Rosselló-Móra, R. and Kämpfer, P. (2010). Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(1), 249-266. doi: 10.1099/ijs.0.016949-0
- Tonkova, E. and Gesheva, V. (2007). Biosurfactant Production by Antarctic Facultative Anaerobe *Pantoea* sp. During Growth on Hydrocarbons. *Current Microbiology*, 54(2), 136-141. doi: 10.1007/s00284-006-0345-6
- Toro, M., Oro, N., Vega, A., Maturano, Y., Nally, M., Fernández, E., Pucheta, E. y Vázquez, F. (2005). Diversidad de levaduras en canopias y suelos asociados con *Bulnesia retama* y *Larrea divaricata*. *Revista Argentina de Microbiología*, 37(4), 209-213. ISSN: 0325-7541
- Tortora, G.J., Funke, B.R. y Case, C.L. (2007). *Introducción a la Microbiología*. Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana. Cap. 3, 6 y 10, pp.70, 173 y 284. ISBN: 978-950-06-0740-7
- Van, E., Winter, R., Kolmar, H. and Fraaije, M. (2011). Decorating microbes: surface display of proteins on *Escherichia coli*. *Trends in Biotechnology*, 29(2), 79-86. doi: 10.1016/j.tibtech.2010.11.003
- Vargas, G., Treichel, H., Oliveira, D., Beneti, S., Freire, D. and Luccio, M. (2008). Optimization of lipase production by *Penicillium simplicissimum* in soybean meal. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 83(1), 47-54. doi: 10.1002/jctb
- Vargas, T y Villazante, L. (2014). Clasificación de los microorganismos. *Revista de Actualización Clínica*, 44(1), 2309-2313. ISSN 2304-3768

- Vargas, T. and Kuno, A. (2014). Morfología bacteriana. *Revista de Actualización Clínica*, 49(2). 2594-2598. ISSN 2304-3768
- Waghmode, S., Suryavanshi, M., Dama, L., Kansara, S., Ghattargi, V., Das, P., Banpurkar, A. and Satpute, S. (2019). Genomic Insights of Halophilic *Planococcus maritimus* SAMP MCC 3013 and Detail Investigation of Its Biosurfactant Production. *Frontiers in Microbiology*, 10(1), 235-249. doi: 10.3389/fmicb.2019.00235
- Wang, H., Zheng, X., Su, J., Tian, Y., Xiong, X. y Zheng, T. (2009). Biological decolorization of the reactive dyes Reactive Black 5 by a novel isolated bacterial strain *Enterobacter* sp. EC3. *Journal of Hazardous Materials*, 171(1-3), 654-659. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.06.050>
- Wang, J-P., Liu, B., Liu, G-H., Chen, D-J., Chen, Q-Q., Zhu, Y-J., Chen, Z. and Che, J-M. (2015). Draft genome sequence of *Bacillus marisflavi* TF-11T (JCM 11544), a carotenoid-producing bacterium isolated from seawater from a tidal flat in the yellow sea. *Genome Announc*, 3(6), 14-15. doi: 10.1128/genomeA.01451-15
- Wang, M., Zhang, Q. and Yao, S. (2015). A novel biosorbent formed of marine-derived *Penicillium janthinellum* mycelial pellets for removing dyes from dye-containing wastewater. *Chemical Engineering Journal*, 259(1), 837–844. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.08.003>
- Wang, S., Zheng, G. and Zhou, L. (2010). Heterotrophic microorganism *Rhodotorula mucilaginosa* R30 improves tannery sludge bioleaching through elevating dissolved CO₂ and extracellular polymeric substances levels in bioleach solution as well as scavenging toxic DOM to Acidithiobacillus species. *Water Research*, 44(18), 5423-5431. doi: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.06.055>.
- Wang, Y., Tian, Y., Han, B., Zhao, H., Bi, J. and Cai, B. (2007). Biodegradation of phenol by free and immobilized *Acinetobacter* sp. strain PD12. *Journal of Environmental Sciences*, 19(1), 222-225. doi: [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(07\)60036-9](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(07)60036-9).
- Xia, X., Cao, X., Liang, P., Huang, X., Yang, S. and Zhao, G. (2010). Electricity generation from glucose by a *Klebsiella* sp. in microbial fuel cells. *Applied microbiology and biotechnology*, 87(1), 383-390. doi: 10.1007/s00253-010-2604-5
- Yamada, K., Mukumoto, H., Katsuyaya, Y., Saiganji, A. and Tani, Y. (2001). Degradation of polyethylene by fungus, *Penicillium simplicissimum* YK. *Polymer degradation and stability*, 72(1), 323-37. doi: [https://doi.org/10.1016/S0141-3910\(01\)00027-1](https://doi.org/10.1016/S0141-3910(01)00027-1)

- Yang, C., Li, Y., Zhang, K., Wang, X., Ma, C., Tang, H. and Xu, P. (2010). Atrazine degradation by a simple consortium of *Klebsiella* sp. A1 and *Comamonas* sp. A2 in nitrogen enriched medium. *Biodegradación*, 21(1), 97-105. doi: <https://doi.org/10.1007/s10532-009-9284-9>
- Yang, T., Man, Z., Rao, Z., Xu, M. Zhang, X and Xu, Z. (2014). Asymmetric reduction of 4-hydroxy-2-butanone to (R)-1,3- butanediol with absolute stereochemical selectivity by a newly isolated strain of *Pichia jadinii*. *Journal and Microbiology Biotechnology*, 41(1), 1743-1752. doi: <https://doi.org/10.1007/s10295-014-1521-5>
- Yao, S., Ni, J., Ma, T. and Li, C. (2013). Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification at low temperature by a newly isolated bacterium, *Acinetobacter* sp. HA2. *Bioresource Technology*, 139(1), 80-86. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.189>.
- Yüce, M., Nazır, H. and Dönmez, G. (2010). A voltammetric *Rhodotorula mucilaginosa* modified microbial biosensor for Cu (II) determination. *Bioelectrochemistry*, 79(1), 66-70. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2009.11.003>
- Zhao, C., Zhang, T., Li, M. and Chi, Z. (2010). Single cell oil production from hydrolysates of inulin and extract of tubers of Jerusalem artichoke by *Rhodotorula mucilaginosa* TJY15a. *Process Biochemistry*, 45(1), 1121-1126. doi: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.04.002>
- Zhao, L., Wang, F. and Zhao, J. (2012). Identification and functional characteristics of chlorpyrifos-degrading and plant growth promoting bacterium *Acinetobacter calcoaceticus*. *Journal of Basic Microbiology*, 54(5), 457-463. doi: [10.1002/jobm.201200639](https://doi.org/10.1002/jobm.201200639)
- Zheng, C., Zhou, J., Wang, J., Qu, B., Wang, J., Lu, H. and Zhao, H. (2009). Aerobic degradation of nitrobenzene by immobilization of *Rhodotorula mucilaginosa* in polyurethane foam. *Journal of Hazardous Materials*, 168(1), 298-303. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.02.029>.

X. ANEXOS

Anexo 1. Descripción de la técnica tinción de Gram para bacterias.

En la Tinción de Gram, inicialmente se prepara y se fija el frotis, en condiciones de asépticas se toma un inóculo de la colonia bacteriana con el asa de siembra y se dispersa en una pequeña gota de solución buffer estéril sobre un portaobjetos. Posteriormente, usando el asa de siembra se extiende homogéneamente la muestra sobre el portaobjetos para formar una capa delgada y uniforme que facilite el secado, el portaobjetos se flamea ligeramente en la llama de un mechero para fijar las células de las bacterias teniendo precaución de no calentar demasiado el portaobjeto porque las células pueden romperse o deformarse. Luego se aplican los colorantes catiónicos de tinción sobre el frotis; empezando por el colorante básico cristal violeta por 1 minuto, de seguido el mordiente yodo-lugol por 1 minuto, alcohol-acetona durante 20 segundos para decolorar la muestra y el colorante de contraste safranina por 1 minuto, entre la aplicación de cada uno de los reactivos de tinción, el frotis se lava suavemente con agua para eliminar el exceso de los colorantes. Finalmente, la muestra teñida se deja secar y se examina en el microscopio OLYMPUS CH-2 con objetivo 100x utilizando aceite de inmersión (López-Jácome *et al*, 2006).

Anexo 2. Descripción de la técnica de cinta adhesiva para la observación de esporas en hongos filamentosos.

La técnica consiste en cortar una tira de cinta de 4 cm con el lado adhesivo hacia afuera, sosteniéndose con pinzas y se presiona firmemente contra la superficie del micelio del hongo que se desea estudiar, el micelio aéreo se une a la superficie adhesiva por lo cual es fácilmente separada. Posteriormente, la tira de cinta se coloca sobre un portaobjetos para hacer las observaciones en el microscopio OLYMPUS BH-2 con objetivo 50x (Arias y Piñeros, 2008).

Anexo 3. Descripción de la técnica tinción simple para hongos levaduriformes

La prueba inicia depositando una gota de solución buffer estéril sobre un portaobjetos, en condiciones asépticas se toma un inóculo de la colonia levaduriforme con el asa de siembra y se transfiere a la gota de agua, se mezcla la muestra con el asa hasta obtener una suspensión homogénea, posteriormente se añade una gota de cristal violeta u otro colorante básico y se cubre con un cubreobjetos. Finalmente se observa en el microscopio con los objetivos 50x y 100x (Moreno y Albarracín, 2012).

Anexo 4. Descripción del código de los cultivos aislados en esta investigación de bioprospección microbiana.

- Primera letra en mayúscula para designar el sitio donde se efectuó el muestreo; Q: Quesera artesanal y M: Planteles mineros.
- Números romanos para diferenciar el punto de muestreo.
- Segunda letra en mayúscula para distinguir el medio de cultivo usado en para el aislamiento masivo del cultivo axénico; A: Agar Nutritivo (AN), B: Agar Luria-Bertani (LB), C: Plate Count Agar (PCA), D: Agar Papa Dextrosa (PDA) y E: Agar Milk (AM).
- Número ordinario antecedido por un guión para denotar el número de aislados correspondiente a cada punto de muestreo.

Anexo 5. Listado de códigos de los cultivos aislados en la quesera artesanal.

Microorganismos aislados en la quesera artesanal						
Puntos de Muestreo	Leche fresca	Leche descremada	Lactosuero salado	Lactosuero simple fermentado	Sedimentos de drenaje	Aguas residuales
Códigos de los cultivos aislados	QIA-01	QIIA-01	QIIIA-01	QIVA-01	QVB-01	QVIA-01
	QIA-02	QIIA-02	QIIIA-02	QIVA-02	QVB-02	QVIB-02
	QIB-03	QIIB-03	QIIIB-03	QIVB-03	QVC-03	QVIB-03
	QIB-04	QIIB-04	QIIIB-04	QIVB-04	QVC-04	QVIC-05
	QIC-06	QIIB-05	QIIIC-05	QIVC-05	QVE-05	QVID-07
	QIE-07	QIIC-06	QIIIC-06	QIVC-06	QVE-06	QVIB-08
	QIE-08	QIIC-07	QIIIC-07	QIVC-07	QVB-07	QVIB-09
	QID-09	QIIE-08	QIIIB-08	QIVE-08	QVB-08	QVIC-10
	QID-10	QIIE-09	QIIIB-09	QIVE-09	QVD-09	QVIE-11
	QIE-11	QIIE-10	QIIIB-10	QIVB-10	QVD-10	QVIA-12
	QIE-12	QIIE-11	QIIIB-11	QIVB-11	QVA-11	QVIA-13
	QIA-13	QIIC-13	QIIIE-12	QIVD-12	QVA-12	QVIB-14
	QIA-14	QIID-14	QIIIE-13	QIVD-13	QVA-13	QVIB-15
	QID-15	QIID-15	QIIIE-14	-	QVA-14	QVIB-16
	QID-16	QIID-16	QIIIE-16	-	QVA-15	QVIE-17
	QID-17	QIID-17	-	-	QVA-16	QVID-18
	-	-	-	-	QVE-17	-
	-	-	-	-	QVE-18	-
	-	-	-	-	QVE-19	-
	-	-	-	-	QVD-20	-
	-	-	-	-	QVD-21	-

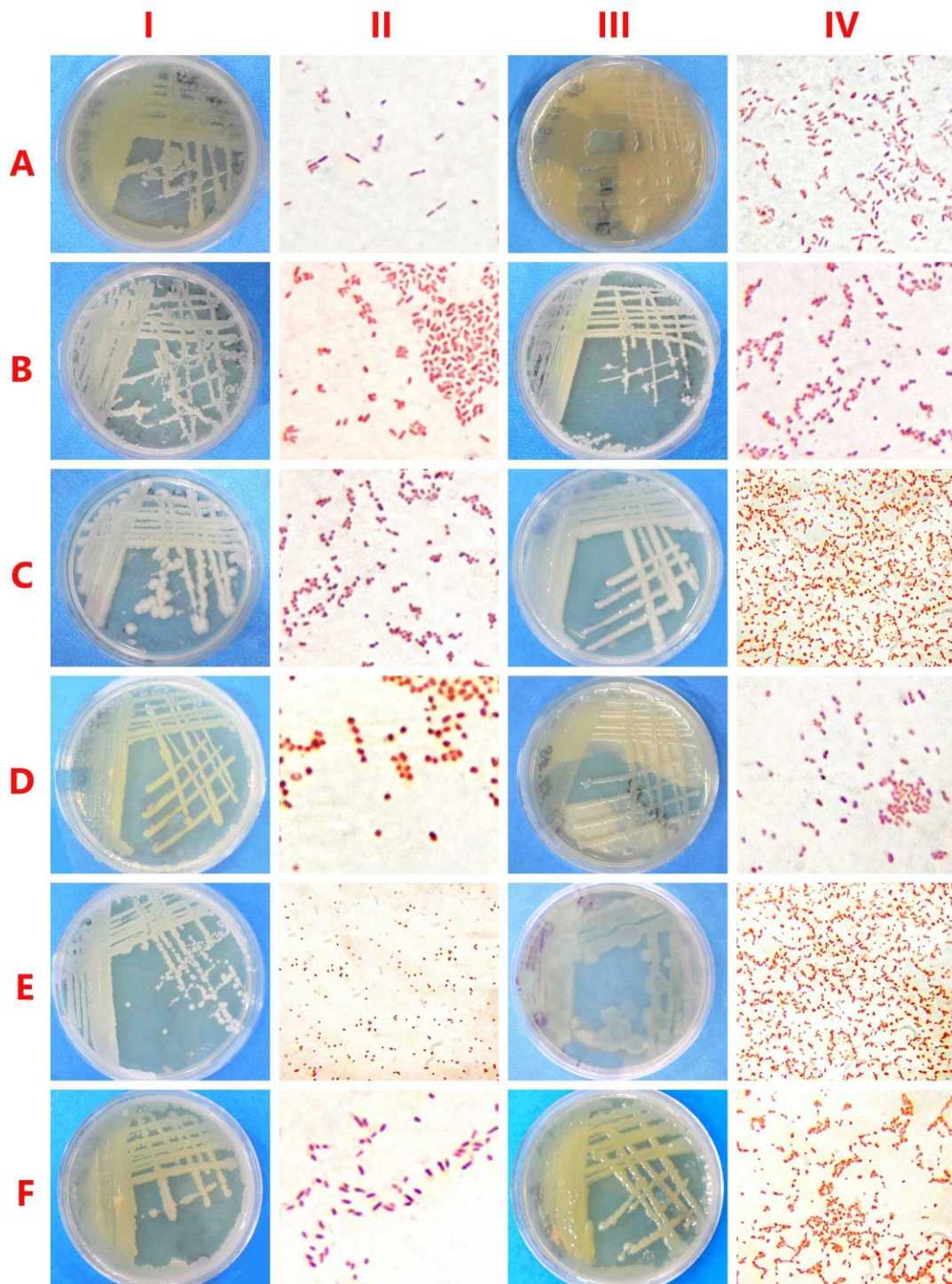
Fuente: Propia

Anexo 6. Listado de códigos de los cultivos aislados en los planteles mineros.

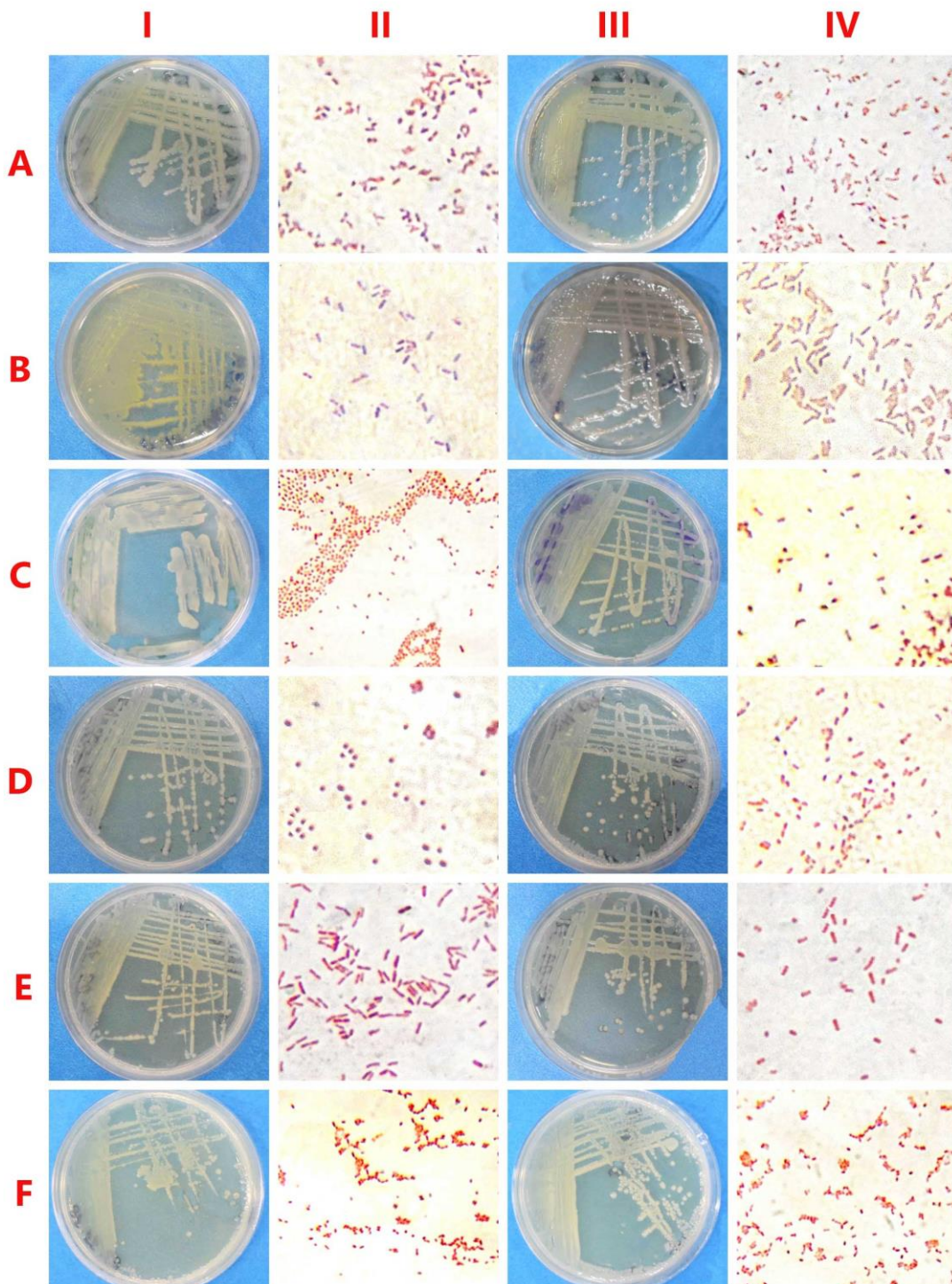
Microorganismos aislados en los planteles mineros							
Puntos de Muestreo	Lodo en dique de cola	Agua residual	Cola o lama fresca	Cola o lama vieja	Agua residual estancada	Sedimentos de drenaje	Suelo de cola
Códigos de los cultivos aislados	MIB-01	MIIB-01	MIIIA-01	MIVB-01	MVB-01	MVIA-01	MVIIA-01
	MIB-02	MIIB-02	MIIIA-02	MIVB-02	MVB-02	MVIB-02	MVIIB-02
	MIB-03	MIIB-03	MIIIA-03	MIVA-03	MVB-03	MVID-03	MVIIC-03
	MIB-04	MIIB-04	MIIB-04	MIVD-04	-	MVID-04	MVIID-04
	MIB-05	-	MIIC-05	MIVD-05	-	MVID-05	MVIID-05
	MID-06	-	MIIC-06	MIVD-06	-	MVIA-06	MVIIA-06
	MID-07	-	MIIC-07	MIVD-07	-	MVIB-07	MVIIA-07
	MID-08	-	MIID-08	MIVD-08	-	MVIC-08	MVIIB-08
	-	-	MIID-09	MIVD-09	-	MVIC-09	MVIIB-09
	-	-	MIID-10	MIVA-10	-	MVIC-10	MVIIC-10
	-	-	MIID-11	MIVB-11	-	MVID-11	MVIIB-11
	-	-	MIIB-12	MIVC-12	-	-	MVIIB-12
	-	-	MIIB-13	MIVC-13	-	-	MVIID-13
	-	-	MIID-14	-	-	-	-

Fuente: Propia

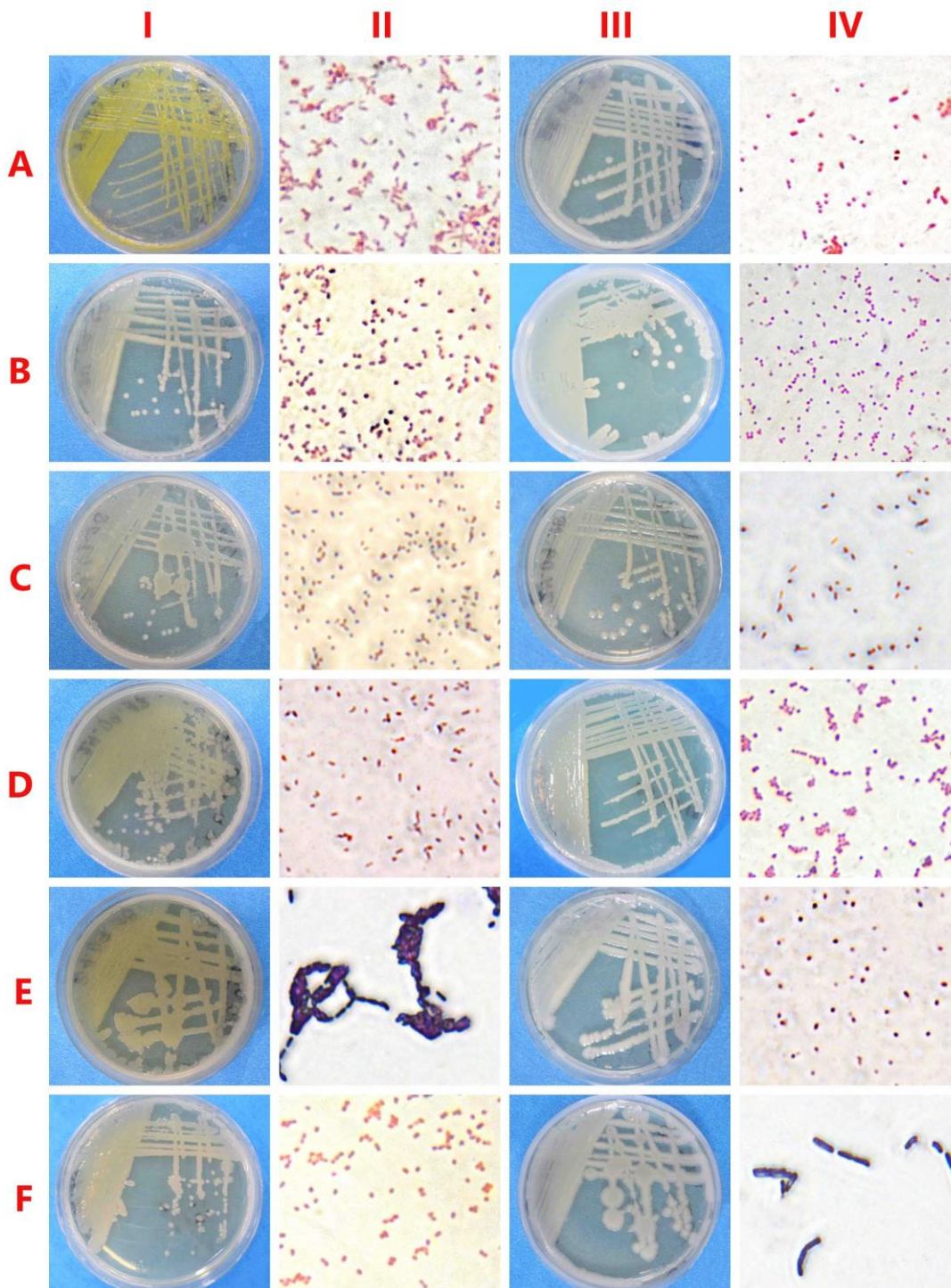
Anexo 7. Se muestran las morfologías macroscópicas de las bacterias en placa de Petri y sus respectivas morfologías microscópicas en tinción de Gram observadas al microscopio con objetivo 100x, asiladas en los puntos de muestreo I y II de la quesera artesanal. AI-AII: QIA-01, AIII-AIV: QIB-03, BI-BII: QIB-04, BIII-BIV: QIC-06, CI-CII: QIE-07, CIII-CIV: QIE-12, DI-DII: QIA-14, DIII-DIV: QIIA-01, EI-EII: QIIA-02, EIII-EIV: QIIB-03, FI-FII: QIIB-04 y FIII-FIV: QIIB-05 (Fuente propia).



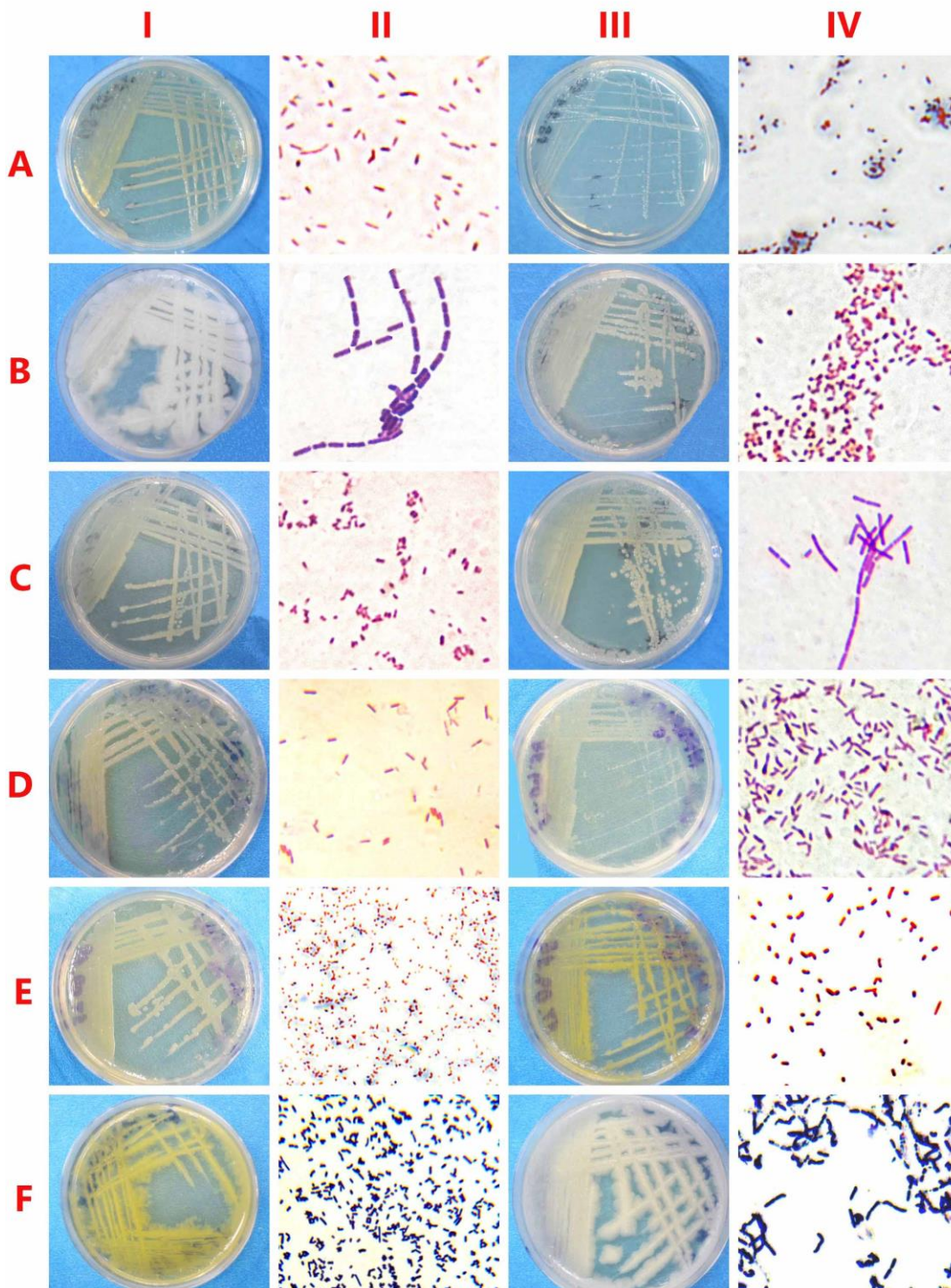
Anexo 8. Se muestran las morfologías macroscópicas de las bacterias en placa de Petri y sus respectivas morfologías microscópicas en tinción de Gram observadas al microscopio con objetivo 100x, asiladas en los puntos de muestreo II y III de la quesera artesanal. **AI-AII:** QIIC-06, **AIII-AIV:** QIIC-07, **BI-BII:** QIIE-08, **BIII-BIV:** QIIE-09, **CI-CII:** QIIIA-01, **CIII-CIV:** QIIIA-02, **DI-DII:** QIIIB-03, **DIII-DIV:** QIIIB-04, **EI-EII:** QIIIC-05, **EIII-EIV:** QIIIC-06, **FI-FII:** QIIIC-07 y **FIII-FIV:** QIIIB-08 (Fuente propia).



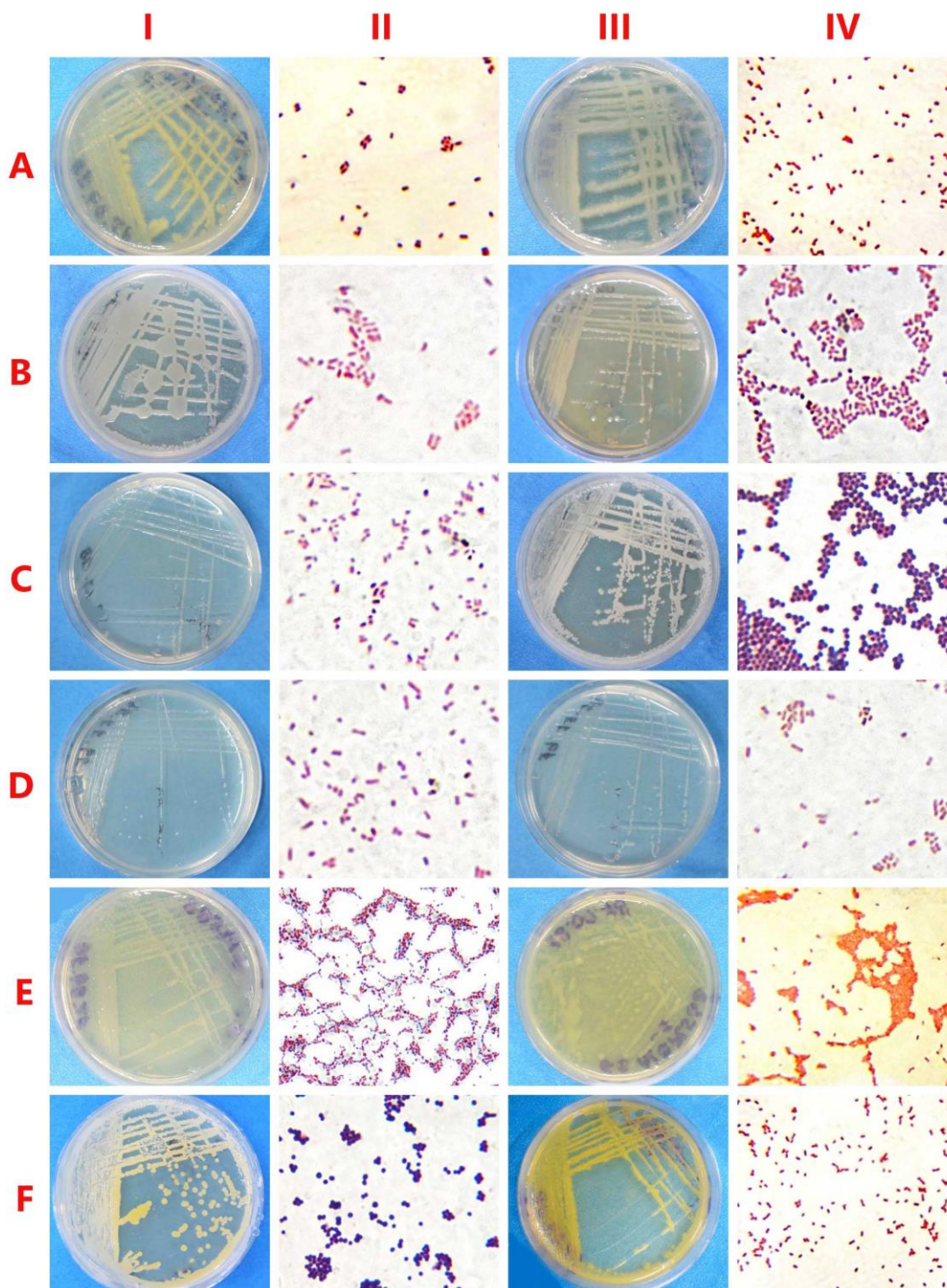
Anexo 9. Se muestran las morfologías macroscópicas de las bacterias en placa de Petri y sus respectivas morfologías microscópicas en tinción de Gram observadas al microscopio con objetivo 100x, asiladas en los puntos de muestreo III, IV y V de la quesera artesanal. AI-AII: QIIIB-11, AIII-AIV: QIIIE-13, BI-BII: QIIIE-14, BIII-BIV: QIVA-01, CI-CII: QIVA-02, CIII-CIV: QIVB-03, DI-DII: QIVB-04, DIII-DIV: QIVC-06, EI-EII: QIVC-07, EIII-EIV: QIVE-09, FI-FII: QIVB-11 y FIII-FIV: QVB-01 (Fuente propia).



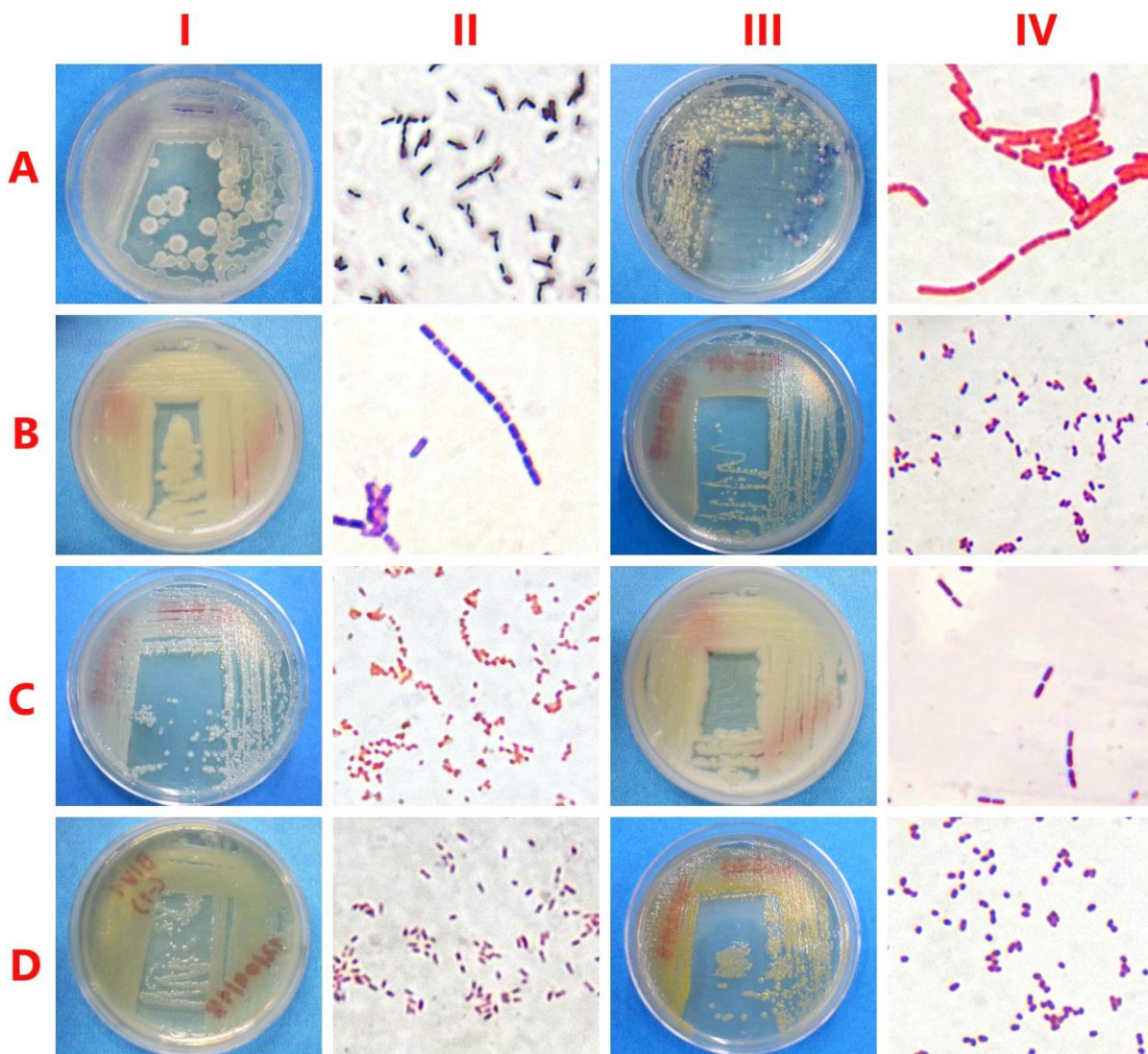
Anexo 10. Se muestran las morfologías macroscópicas de las bacterias en placa de Petri y sus respectivas morfologías microscópicas en tinción de Gram observadas al microscopio con objetivo 100x, asiladas en el punto de muestreo V de la quesera artesanal. AI-AII: QVC-03, AIII-AIV: QVC-04, BI-BII: QVE-05, BIII-BIV: QVB-07, CI-CII: QVB-08, CIII-CIV: QVA-11, DI-DII: QVA-12, DIII-DIV: QVB-13, EI-EII: QVA-14, EIII-EIV: QVA-15, FI-FII: QVA-16 y FIII-FIV: QVE-17 (Fuente propia).



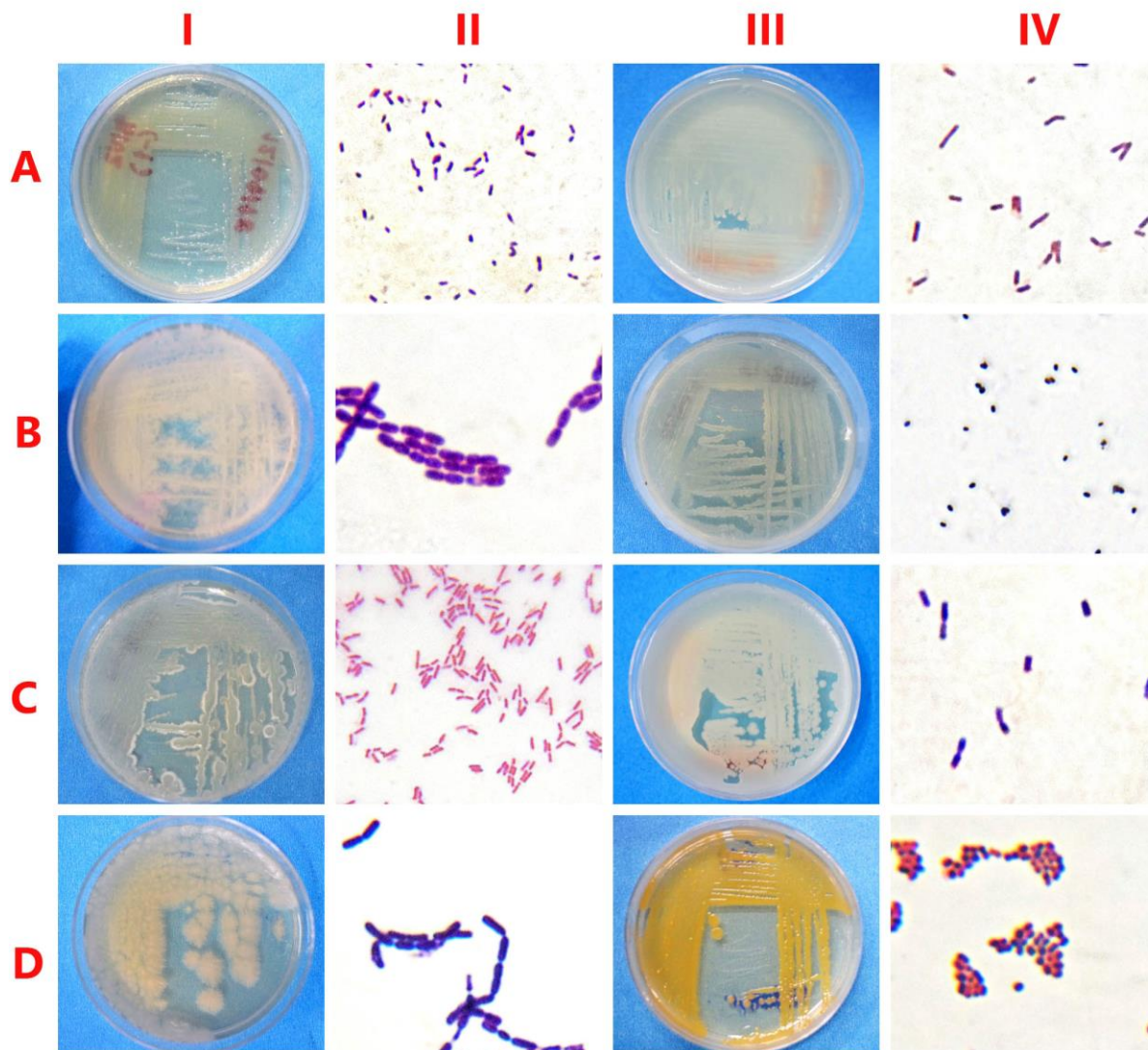
Anexo 11. Se muestran las morfologías macroscópicas de las bacterias en placa de Petri y sus respectivas morfologías microscópicas en tinción de Gram observadas al microscopio con objetivo 100x, asiladas en los puntos de muestreo V y VI de la quesera artesanal. **AI-AII:** QVE-18, **AIII-AIV:** QVE-19, **BI-BII:** QVIA-01, **BIII-BIV:** QVIB-02, **CI-CII:** QVIB-03, **CIII-CIV:** QVIC-05, **DI-DII:** QVIB-09, **DIII-DIV:** QVIC-10, **EI-EII:** QVIA-13, **EIII-EIV:** QVIB-14, **FI-FII:** QVIB-15 y **FIII-FIV:** QVIB-16 (Fuente propia).



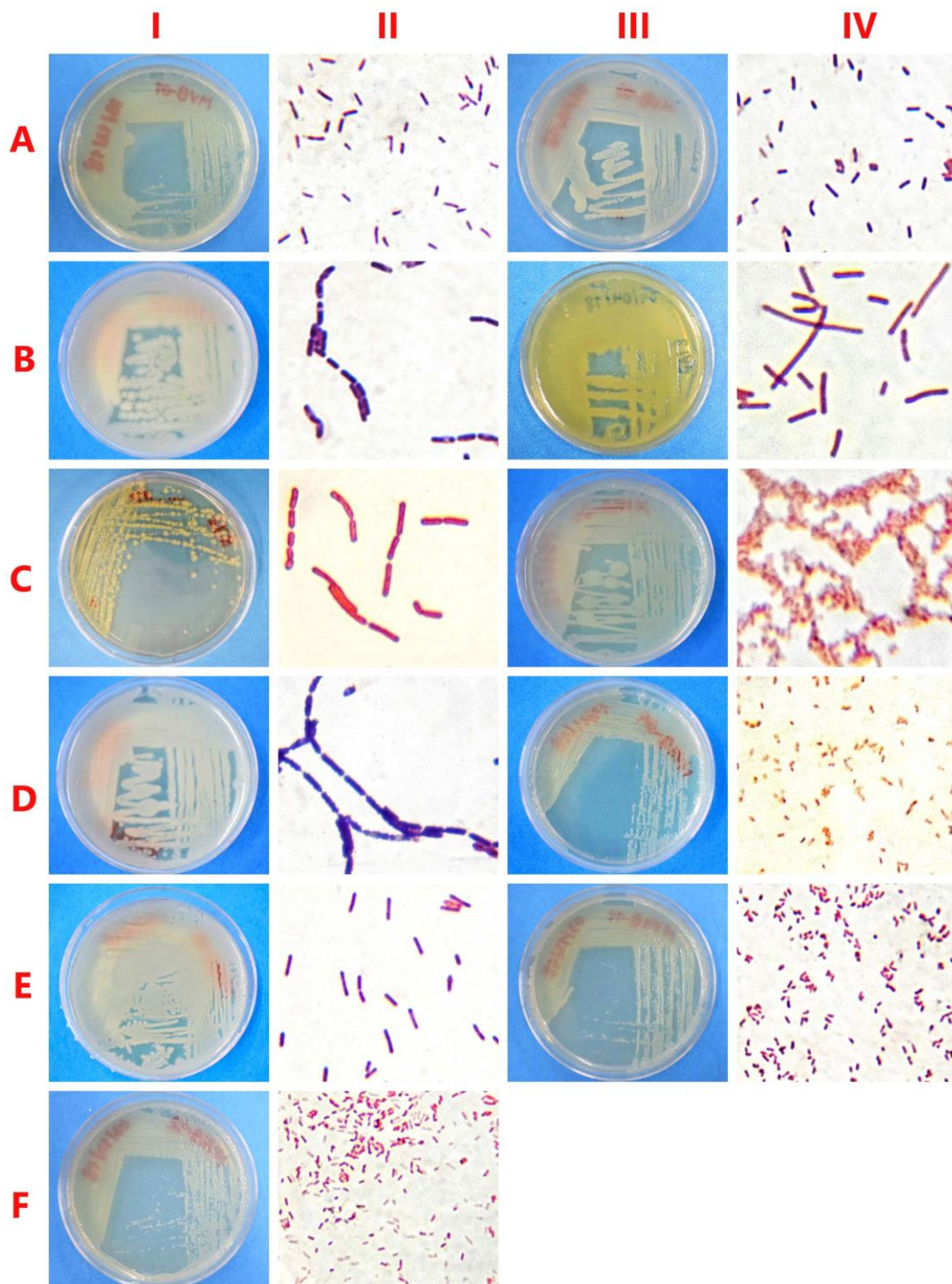
Anexo 12. Se muestran las morfologías macroscópicas de las bacterias en placa de Petri y sus respectivas morfologías microscópicas en tinción de Gram observadas al microscopio con objetivo 100x, asiladas en los puntos de muestreo I y II de los planteles mineros. AI-AII: MIB-01, AIII-AIV: MIB-02, BI-BII: MIB-03, BIII-BIV: MIB-04, CI-CII: MIB-05, CIII-CIV: MIIB-01, DI-DII: MIIB-02 y DIII-DIV: MIIB-03 (Fuente propia).



Anexo 13. Se muestran las morfologías macroscópicas de las bacterias en placa de Petri y sus respectivas morfologías microscópicas en tinción de Gram observadas al microscopio con objetivo 100x, asiladas en los puntos de muestreo II, III y IV de los planteles mineros. AI-AII: *MIIB-04*, AIII-AIV: *MIIIA-02*, BI-BII: *MIIC-05*, BIII-BIV: *MIIB-12*, CI-CII: *MIIB-13*, CIII-CIV: *MIVA-03*, DI-DII: *MIVA-10* y DIII-DIV: *MIVC-12* (Fuente propia).



Anexo 14. Se muestran las morfologías macroscópicas de las bacterias en placa de Petri y sus respectivas morfologías microscópicas en tinción de Gram observadas al microscopio con objetivo 100x, asiladas en los puntos de muestreo V, VI y VII de los planteles mineros. AI-AII: MVB-01, AIII-AIV: MVB-03, BI-BII: MVIA-06, BIII-BIV: MVIC-10, CI-CII: MVIIB-02, CIII-CIV: MVIIA-06, DI-DII: MVIIA-07, DIII-DIV: MVIIB-09, EI-EII: MVIIC-10, EIII-EIV: MVIIB-11, FI-FII: MVIIB-12 (Fuente propia).



Anexo 15. Tabla de caracterización morfológica macroscópica y microscópica de las bacterias aisladas en la quesera artesanal.

Código	Características morfológicas de bacterias	
	Observación macroscópica Apariencia de la colonia	Observación microscópica Resultado de tinción de Gram
MUESTRA I: LECHE FRESCA		
QIA-01	Colonias medianas, planas, de color pardo o café, opacas y mucoides, de forma irregular y bordes ondulados.	Bacilos Gram negativos cortos y delgados, dispuestos en pares o en cadenas cortas.
QIB-03	Colonias moderadamente grandes, planoconvexas, de color pardo, opacas y mucoides, de forma irregular y bordes ondulados.	Bacilos Gram negativos cortos y delgados, dispersos.
QIB-04	Colonias pequeñas, superficie convexa, blancas, brillantes y cremosas, de forma puntiforme y bordes redondeados.	Bacilos Gram negativos cortos, dispuestos en cadenas de cortas.
QIC-06	Colonias pequeñas, superficie convexa, blancas, brillantes y cremosas, de forma puntiforme y bordes redondeados.	Cocos Gram negativos dispersos o asociados en racimos.
QIE-07	Colonias moderadamente grandes, planoconvexas, con centro blanco brillante, cremoso, de forma circular y bordes redondeados.	Cocos Gram negativos dispersos o asociados en racimos.
QIE-12	Colonias medianas y acuminadas, blancas, brillantes y cremosas, de forma fusiforme y circular con bordes redondeados.	Cocos Gram negativos bien agrupados.
QIA-14	Colonias pequeñas, convexas, amarillas, brillantes y cremosas, de forma circular y bordes redondeados.	Cocos Gram negativos, dispuestos en racimos.
MUESTRA II: LECHE DESCREMADA		
QIIA-01	Colonias pequeñas, planas, poco convexas, blanquecinas, brillantes y mucoides, de forma irregular y bordes ondulados.	Cocobacilos Gram negativos, dispersos.
QIIA-02	Colonias pequeñas, planoconvexas, blanquecinas, brillantes y cremosas, de forma circular y bordes redondeados.	Cocos Gram negativos, dispersos o asociados en racimos.
QIIB-03	Colonia mediana, planas, blanquecinas con centro opaco y cremosas, de forma circular y borde liso.	Cocos Gram negativos, dispersos.
QIIB-04	Colonias medianas, planoconvexas, de color pardo o marrón, opacas y mucoides, de forma irregular y bordes ligeramente lobulados.	Bacilos Gram negativos cortos y delgados, dispersos.

Continuación Anexo 15

Código	Características morfológicas de bacterias	
	Observación macroscópica	Observación microscópica
	Apariencia de la colonia	Resultado de tinción de Gram
QIIB-05	Colonias medianas, convexas, amarillentas, brillantes y cremosas, de forma irregular y bordes ondulados.	Cocos Gram negativos dispersos o asociados en racimos.
QIIC-06	Colonias medianas, planas, de color blanquecino o escasamente amarillo, opacas y mucoides, de forma irregular y bordes ondulados.	Bacilos Gram negativos cortos, dispersos o asociados en racimos.
QIIC-07	Colonias medianas, planas, poco convexas, blanquecinas, brillantes y cremosas, de forma puntiforme y fusiforme y bordes redondeados.	Cocobacilos Gram negativos, dispersos.
QIIE-08	Colonias medianas, superficie convexa, amarilla, brillante y cremosa, de forma rizoide y bordes lobulados.	Bacilos Gram positivos cortos, dispersos.
QIIE-09	Colonias medianas, planas, poco convexas, con pigmentación parda o blanquecina, brillantes y mucoides, de forma irregular y bordes ondulados.	Bacilos Gram negativos cortos y delgados, dispersos o asociados en pares.
MUESTRA III: LACTOSUERO SALADO		
QIIIA-01	Colonias medianas, planoconvexa, de color blancas y cremosas, de forma redondeadas y bordes ligeramente ondulados.	Cocobacilos Gram negativos, dispuestos en racimos.
QIIIA-02	Colonias medianas, superficie acuminada, blanquecinas, opacas y mucoides, de forma puntiforme y bordes redondeados.	Cocobacilos Gram negativos, dispersos.
QIIIB-03	Colonias pequeñas, planas, poco convexas, de color pardo o marrón, brillantes y cremosas, de forma puntiforme y bordes redondeados.	Cocobacilos Gram negativos, dispersos.
QIIIB-04	Colonias pequeñas, planoconvexas, blanquecinas, opacas y cremosas, de forma puntiforme o circular con bordes ligeramente ondulados.	Bacilos Gram negativos cortos, dispersos.
QIIIC-05	Colonias pequeñas, planoconvexas, blanquecinas, opacas y cremosas, de forma puntiforme o circular con bordes ligeramente ondulados.	Bacilos Gram negativos, dispersos o asociados en pares.
QIIIC-07	Colonias pequeñas, planoconvexas, amarillentas, opacas y cremosas, de forma puntiforme o circular y bordes ligeramente ondulados.	Cocos Gram negativos, dispersos o asociados en racimos.
QIIIC-06	Colonias pequeñas, planoconvexas, blanquecinas, opacas y cremosas, de forma puntiforme o circular con bordes ligeramente ondulados.	Cocobacilos Gram negativos, dispersos.
QIIIB-08	Colonias pequeñas, convexas, blanquecinas, brillantes y viscosas, de forma irregular y bordes ligeramente ondulados.	Cocos Gram negativos, dispersos o asociados en pares.

Continuación Anexo 15

Código	Características morfológicas de bacterias	
	Observación macroscópica	Observación microscópica
	Apariencia de la colonia	Resultado de tinción de Gram
QIIIB-11	Colonias pequeñas, planas, amarillas, muy brillantes y mucoides, de forma puntiforme y bordes redondeados.	Cocos Gram negativos, asociados en racimos.
QIIIE-13	Colonias medianas, superficie acuminada, blancas, con centro brillante y cremosas, de forma circular y bordes ligeramente ondulados.	Cocos Gram negativos, dispersos.
QIIIE-14	Colonias pequeñas, planoconvexas, blanquecinas, brillantes y cremosas, de forma puntiforme y bordes ondulados.	Cocos Gram negativos, dispersos.
MUESTRA IV: LACTOSUERO SIMPLE FERMENTADO		
QIVA-01	Colonias medianas, planas, poco convexas, blancas como cera, brillantes y cremosas, de forma circular y bordes redondeados.	Cocos Gram negativos, dispersos.
QIVA-02	Colonias medianas, planas, poco convexas, blanquecinas, opacas y cremosas, de forma irregular y bordes redondeados.	Cocos Gram negativos, dispersos.
QIVB-03	Colonias medianas, acuminadas, blanquecinas, brillantes y viscosas, de forma circular y bordes redondeados.	Cocobacilos Gram negativos, dispersos.
QIVB-04	Colonias medianas, acuminadas, blanquecinas o amarillentas, opacas, con apariencia de estar resacas, de forma fusiforme y bordes redondeados.	Bacilos Gram negativos cortos, dispersos.
QIVC-06	Colonias medianas, planoconvexas, blanquecinas, brillantes y cremosas, de forma circular y bordes redondeados o ligeramente ondulados.	Cocos Gram negativos, dispuestos en racimos.
QIVC-07	Colonias medianas, planoconvexas, con pigmentaciones pardas o marrón, opacas y mucoides, de forma irregular y bordes ondulados.	Bacilos Gram positivos, dispuestos en pares o en cadenas cortas.
QIVE-09	Colonias grandes, convexas, blancas, cremosas y brillantes, de forma puntiforme y ligeramente fusiforme y bordes redondeados.	Cocos Gram negativos, dispersos.
QIVB-11	Colonias medianas, planas, poco convexas, blanquecinas y amarillentas, brillantes y mucoides, de forma circular y bordes ondulados.	Cocobacilos Gram positivos, dispersos.

Continuación Anexo 15

Código	Características morfológicas de bacterias	
	Observación macroscópica Apariencia de la colonia	Observación microscópica Resultado de tinción de Gram
MUESTRA V: SEDIMENTOS DE DRENAJE		
QVB-01	Colonias medianas, planas, blancas, con centro brillante y cremoso, de forma circular y bordes redondeados.	Bacilos Gram positivos en forma de barra, dispuestos en pares o en cadenas cortas.
QVC-03	Colonias pequeñas, planas, poco convexas, de color pardo o marrón, opacas y mucoides, de forma circular y bordes redondeados.	Bacilos Gram negativos delgados, dispersos.
QVC-04	Colonias medianas, planas, amarillentas, opacas y cremosas, de forma irregular y bordes rizoides.	Cocos Gram negativos bien agrupados.
QVE-05	Colonias moderadamente grandes, planas, blancas, con centro opaco y viscosas, de forma irregular y bordes redondeados.	Bacilos Gram positivos en forma de barra, dispuestos en cadenas largas.
QVB-07	Colonias pequeñas, planas, poco convexas, blanquecinas, opacas y cremosas, de forma puntiforme y bordes redondeados.	Cocobacilos Gram negativos bien agrupados.
QVB-08	Colonias medianas, planas, poco convexas, blanquecinas, brillantes y cremosas, de forma puntiforme y bordes ondulados.	Cocobacilos Gram negativos, dispersos.
QVA-11	Colonias medianas, convexas, blanquecinas, opacas y cremosas, de forma circular y bordes lisos redondeados.	Bacilos Gram positivos delgados y rectos, dispuestos en cadenas cortas.
QVA-12	Colonias pequeñas, convexas, pigmentación crema o amarillenta, brillantes y mucoides, de forma circular y bordes redondeados.	Cocos Gram negativos, dispersos.
QVA-13	Colonias pequeñas, acuminadas, amarillentas, opacas, con apariencia de estar secas, formas irregulares y bordes onduladas.	Bacilos Gram negativos cortos y delgados, dispersos.
QVA-14	Colonias medianas, planas, poco convexas, amarillas, brillantes y cremosas, forma circular y bordes redondeados.	Cocos Gram negativos, dispersos.
QVA-15	Colonias medianas, planas, amarillas, brillantes y mucoides, forma irregular y bordes lobulados.	Bacilos Gram positivos cortos, dispuestos en pares.
QVA-16	Colonias medianas, planas, amarillentas, brillantes y viscosas, de forma irregular y bordes rizoides.	Bacilos Gram positivos cortos, dispuestos en cadenas cortas.
QVE-17	Colonias grandes, planas, blanquecinas como cera, opacas y cremosas, de forma fusiforme y bordes redondeados.	Bacilos Gram positivos en forma de barra, dispuestos en cadenas cortas.

Continuación Anexo 15

Código	Características morfológicas de bacterias	
	Observación macroscópica	Observación microscópica
	Apariencia de la colonia	Resultado de tinción de Gram
QVE-18	Colonias medianas, plana, amarillentas, brillantes y cremosas, forma irregular y bordes lobulados.	Cocobacilos Gram positivos, dispersos.
QVE-19	Colonias medianas, convexas, blanquecinas, opacas y cremosas, de forma circular y bordes redondeados.	Cocos Gram negativos, dispersos.
MUESTRA VI: AGUAS RESIDUALES		
QVIA-01	Colonias pequeñas, planoconvexas, blanquecinas como cera, brillantes y cremosas, de forma fusiforme y bordes ondulados.	Cocobacilos Gram negativos, dispersos.
QVIB-02	Colonias medianas, planoconvexas, blanquecinas, opacas y cremosas, de forma puntiforme y bordes redondeados.	Cocos Gram negativos, dispuestos en racimos.
QVIB-03	Colonias medianas, planoconvexas, amarillentas, opacas y mucoides, de forma irregular y bordes rizoides.	Cocos Gram negativos, dispuestos en racimos.
QVIC-05	Colonias pequeñas, planas, poco convexas, blancas, brillantes y cremosas, de forma puntiforme y bordes redondeados.	Cocos Gram positivos, dispuestos en racimos.
QVIB-09	Colonias medianas, planoconvexas, blanquecinas, opacas y mucoides, de forma irregular y bordes ondulados.	Cocos Gram negativos, dispersos o asociados en pares (diplococos).
QVIC-10	Colonias moderadamente grandes, planas, amarillentas, opacas y viscosas, de forma irregular y bordes rizoides.	Cocos Gram negativos, dispersos.
QVIA-13	Colonias pequeñas, planoconvexa, blanquecinas, opacas y cremosas, de forma circular y bordes ondulados.	Cocos Gram negativos, dispersos.
QVIB-14	Colonias medianas, planas, amarillentas, opacas y cremosas, de forma irregular y bordes ondulados.	Cocos Gram negativos bien agrupados.
QVIB-15	Colonias pequeñas, planas, amarillentas, brillantes y cremosas, de forma circular con bordes redondeados.	Cocos Gram positivos, dispuestos en racimos.
QVIB-16	Colonias medianas, planoconvexas, amarillas, opacas y mucoides, de forma irregular y bordes lobulados.	Bacilos Gram positivos cortos, generalmente dispuestos en pares.

Fuente: Propia

Anexo 16. Tabla de caracterización morfológica macroscópica y microscópica de las bacterias aisladas en los planteles mineros.

Código	Características morfológicas de bacterias	
	Observación macroscópica	Observación microscópica
	Apariencia de la colonia	Resultado de tinción de Gram
MUESTRA I: LODO EN DIQUE DE COLA		
MIB-01	Colonia blanca y translúcida, brillante, forma circular, borde lobulado, superficie convexa y consistencia mucoide.	Diplobacilos pequeños Gram positivos.
MIB-02	Colonia crema y un poco translúcida, brillante, forma circular, borde entero, superficie convexa y consistencia seca.	Diplobacilos grandes Gram negativos.
MIB-03	Colonia crema, opaca, forma irregular, borde ondulado, superficie plana y consistencia seca.	Bacilos grandes Gram positivos.
MIB-04	Colonia amarilla-naranja, brillante, forma circular, borde liso, superficie convexa y consistencia cremosa.	Diplococos grandes Gram positivos.
MIB-05	Colonia blanca, brillante, forma circular, borde liso, superficie convexa y consistencia cremosa.	Coco pequeños Gram negativos.
MUESTRA II: AGUA RESIDUAL		
MIIB-01	Colonia crema, opaca, forma irregular, borde ondulado, superficie plana y consistencia seca.	Diplobacilos medianos Gram positivos.
MIIB-02	Colonia amarilla y translúcida, brillante, forma circular, borde entero, superficie plana y consistencia cremosa.	Cocobacilos medianos Gram positivos.
MIIB-03	Colonia amarilla-naranja, brillante, forma circular, borde liso, superficie convexa y consistencia cremosa.	Diplococos grandes Gram positivos.
MIIB-04	Colonia crema y translúcida, brillante, forma circular, borde entero, superficie plana y consistencia cremosa.	Diplococos grandes Gram positivos.
MUESTRA III: COLA O LAMA FRESCA		
MIIIA-02	Colonia blanca, opaca, forma irregular, borde ondulado, superficie plana y consistencia seca.	Diplobacilos medianos Gram positivos.
MIIC-05	Colonia blanca, opaca, forma rizoide, borde filamentoso, superficie plana y superficie seca.	Estreptobacilos grandes Gram positivos.

Continuación Anexo 16

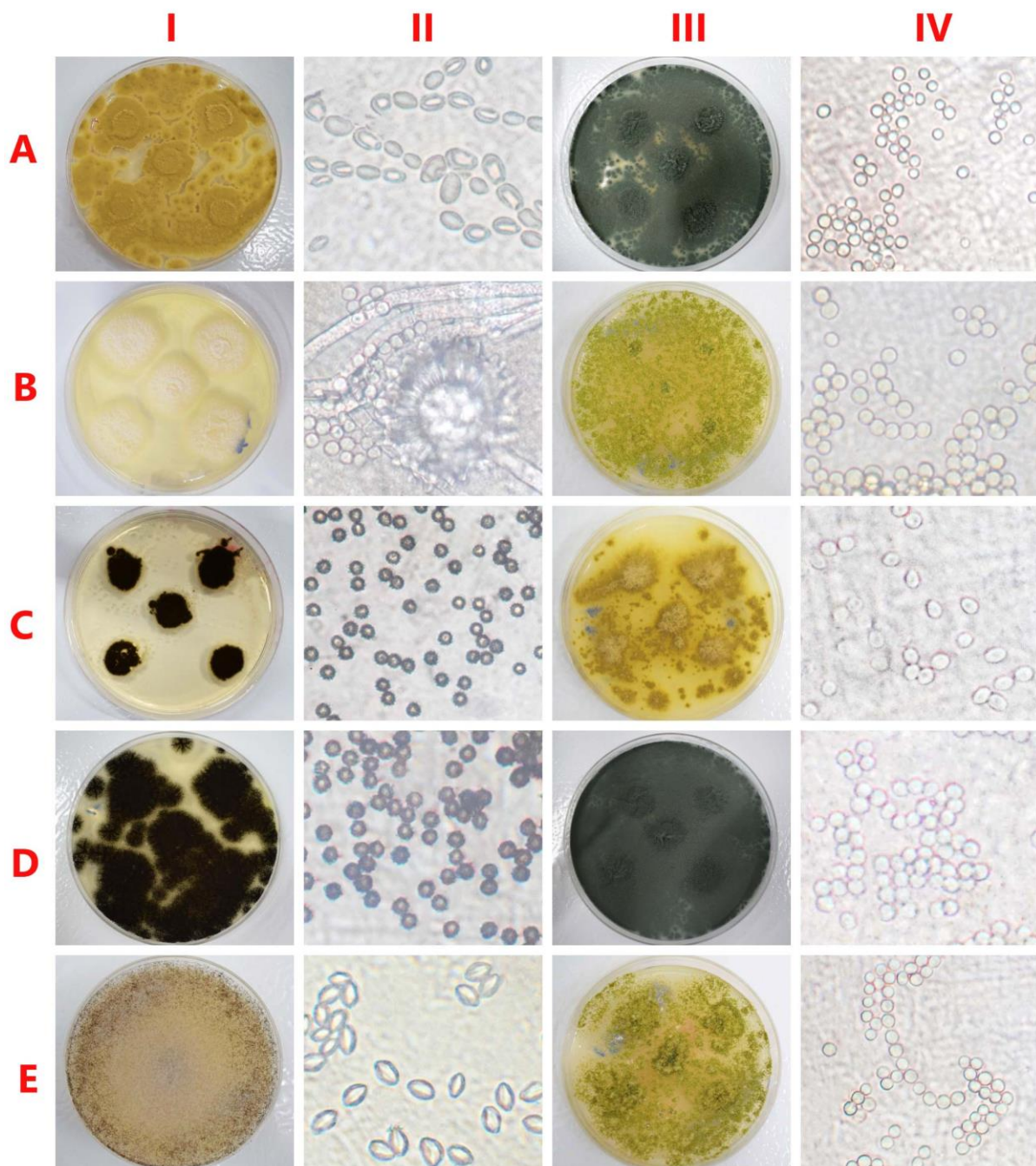
Código	Características morfológicas de bacterias	
	Observación macroscópica	Observación microscópica
	Apariencia de la colonia	Resultado de tinción de Gram
MIIB-12	Colonia blanca y traslucida, brillante, forma circular, borde lobulado, superficie convexa y consistencia mucoide.	Diplococos grandes Gram positivos.
MIIB-13	Colonia crema y traslucida, brillante, forma circular, borde lobulado, superficie convexa y consistencia mucoide.	Diplobacilos pequeños Gram negativos.
MUESTRA IV: COLA O LAMA VIEJA		
MIVA-03	Colonia blanca, opaca, forma circular, borde entero, superficie plana y consistencia cremosa.	Diplobacilos medianos Gram positivos.
MIVA-10	Colonia crema, opaca, forma irregular, borde lobulado, superficie plana y consistencia cremosa.	Estreptobacilos medianos Gram positivos.
MIVC-12	Colonia amarilla, brillante, forma circular, borde ondulado, superficie convexa y consistencia cremosa.	Cocos grandes Gram positivos.
MUESTRA V: AGUA RESIDUAL ESTANCADA		
MVB-01	Colonia crema, brillante, forma puntiforme, borde entero, superficie convexa y consistencia cremosa.	Cocobacilos medianos Gram negativos.
MVB-03	Colonia crema, brillante, forma puntiforme, borde entero, superficie convexa y consistencia cremosa.	Cocos grandes Gram positivos.
MUESTRA VI: SEDIMENTOS DE DRENAJE		
MVIA-06	Colonia blanca, opaca, forma circular, borde ondulado, superficie plana y consistencia seca.	Estreptobacilos medianos Gram positivos.
MVIC-10	Colonia amarilla, brillante, forma irregular, borde ondulado, superficie plana y consistencia cremosa	Estreptobacilos medianos Gram negativos.
MUESTRA VII: SUELO DE COLAS		
MVIIB-02	Colonia crema, brillante, forma circular, borde ondulado, superficie convexa y consistencia seca.	Diplobacilos medianos Gram negativos.
MVIIA-06	Colonia crema, brillante, forma irregular, borde entero, superficie plana y consistencia mucoide.	Cocos pequeños Gram negativos.

Continuación **Anexo 16**

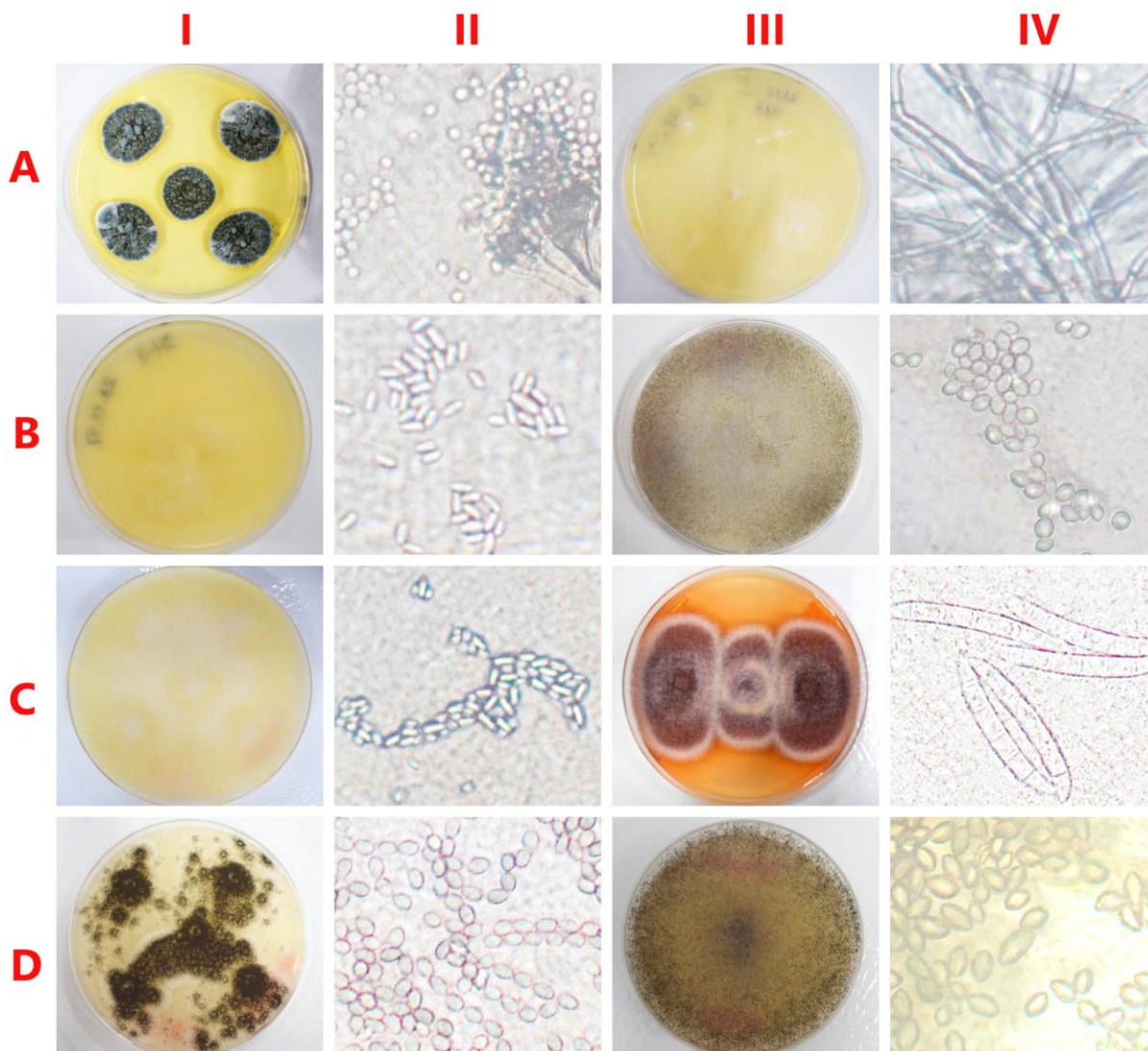
Código	Características morfológicas de bacterias	
	Observación macroscópica Apariencia de la colonia	Observación microscópica Resultado de tinción de Gram
MVIIA-07	Colonia blanca, opaca, forma circular, borde entero, superficie convexa y consistencia cremosa.	Estreptobacilos grandes Gram positivos.
MVIIB-09	Colonia crema, brillante, forma puntiforme, borde ondulado, superficie convexa y consistencia cremosa.	Cocos pequeños Gram negativos.
MVIIC-10	Colonia blanca, opaca, forma irregular, borde lobulado, superficie plana y consistencia cremosa.	Diplobacilos medianos Gram positivos.
MVIIB-11	Colonia crema y translúcida, brillante, forma puntiforme, borde entero, superficie plana y consistencia mucoide.	Cocos medianos Gram negativos.
MVIIB-12	Colonia blanca y translúcida, brillante, forma puntiforme, borde entero, superficie plana y consistencia mucoide.	Cocos medianos Gram negativos.

Fuente: Propia

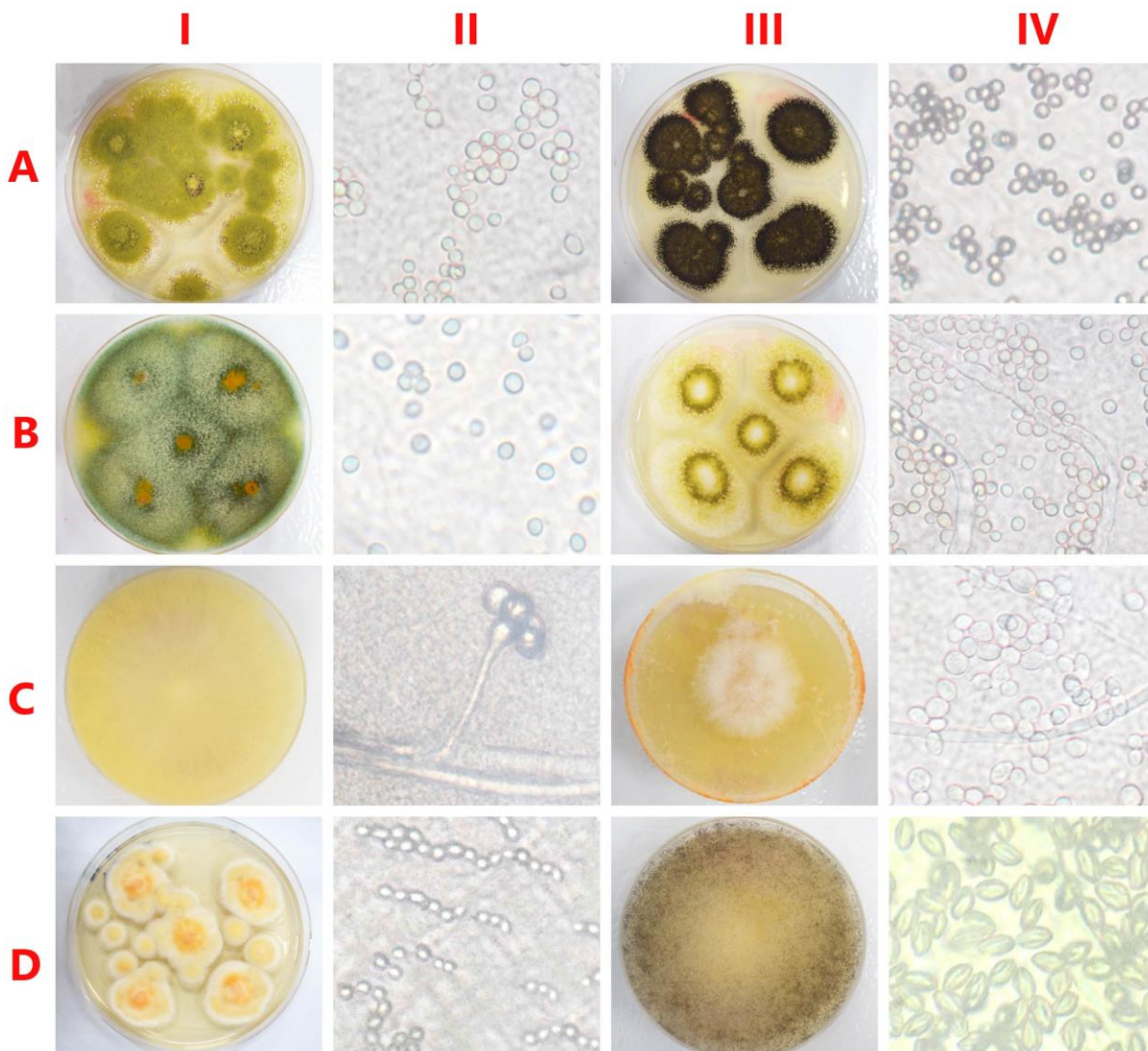
Anexo 17. Se muestran las características morfologías macroscópicas de los hongos filamentosos en placa de Petri y sus respectivas morfologías microscópicas de esporas al microscopio con un objetivo de 50x, aislados en los puntos de muestro I, II, IV, V y VI de la quesera artesanal. AI-AII: QID-10, AIII-AIV: QIID-14, BI-BII: QIID-15, BIII-BIV: QIID-16, CI-CII: QIID-17, CIII-CIV: QVID-13, DI-DII: QVD-09, DIII-DIV: QVD-10, EI-EII: QVID-07 y EIII-EIV: QVID-18 (Fuente propia).



Anexo 18. Se muestran las características morfologías macroscópicas de los hongos filamentosos en placa de Petri y sus respectivas morfologías microscópicas de esporas al microscopio con un objetivo de 50x, aislados en los puntos de muestro I, III y IV de los planteles mineros. AI-AII: MID-06, AIII-AIV: MID-07, BI-BII: MIIID-08, BIII-BIV: MIIID-09, CI-CII: MIIID-10, CIII-CIV: MIIID-14, DI-DII: MIVD-04 y DIII-DIV: MIVD-05 (Fuente propia).



Anexo 19. Se muestran las características morfologías macroscópicas de los hongos filamentosos en placa de Petri y sus respectivas morfologías microscópicas de esporas al microscopio con un objetivo de 50x, aislados en los puntos de muestro IV, VI y VII de los planteles mineros. AI-AII: MIVD-06, AIII-AIV: MIVD-07, BI-BII: MIVD-08, BIII-BIV: MVID-04, CI-CII: MVID-05, CIII-CIV: MVIID-04, DI-DII: MVIID-05 y DIII-DIV: MVIID-13 (Fuente propia).



Anexo 20. Tabla de caracterización morfológica macroscópica y microscópica de los hongos filamentosos aislados en la quesera artesanal.

Código	Características morfológicas de hongos de filamentosos					Observación microscópica
	Observación macroscópica					
	Color del cultivo en placa		Apariencia del micelio			
	Anverso	Reverso				
MUESTRA I: LECHE FRESCA						
QID-10	Café claro, con puntos de pigmentación café oscuro y claro.	Café claro con contornos claros y puntos de pigmentación café oscuro y claro.	Colonia granulosa, forma irregular, plana, extendida, margen lobulado, crecimiento no solo en los puntos de siembra y consistencia seca.	Forma de pera, lisa y contorno fino.		
MUESTRA II: LECHE DESCREMADA						
QIID-14	Plomo.	Plomo con cremas.	Colonia polvosa, forma irregular, plana, extendida, margen lobulado, superficie plegada crecimiento no solo en los puntos de siembra y consistencia blanda.	Forma redonda, lisa y contorno fino.		
QIID-15	Crema.	Crema con un centro más oscuro	Colonia aterciopelada, forma circular, plana, extendida, margen entero, superficie plegada, crecimiento limitado a los puntos de siembra y consistencia blanda.	Forma redonda y lisa.		
QIID-16	Verde.	Crema.	Colonia granulosa, forma irregular, plana, extendida, margen rizoide, crecimiento no solo en los puntos de siembra y consistencia seca.	Forma redonda y lisa.		
QIID-17	Negro.	Café claro y contorno crema.	Colonia polvosa, forma circular, plana, extendida, margen lobulado, crecimiento limitado a los puntos de siembra y consistencia blanda.	Forma redonda, hiladas y contorno grueso.		
MUESTRA IV: LACTOSUERO SIMPLE FERMENTADO						
QIVD-13	Café claro y pigmentación crema difusible en el medio.	Café claro, contorno crema y pigmentación difusible en el medio.	Colonia vellosa, forma filamentosa, elevada, limitada, margen desflecado, superficie con surcos radiados, crecimiento no solo en los puntos de siembra y consistencia blanda.	Forma ovalada y lisa.		

Continuación Anexo 20

Código	Características morfológicas de hongos de filamentosos				
	Observación macroscópica				Observación microscópica
	Color del cultivo en placa		Apariencia del micelio	Forma de esporas	
	Anverso	Reverso			
MUESTRA V: SEDIMENTOS DE DRENAJE					
QVD-09	Negro y pigmentación crema difusible en el medio	Crema y contorno más claro	Colonia polvosa, forma circular, plana, extendida, margen rizoide, superficie cerebriforme, crecimiento no solo en los puntos de siembra y consistencia blanda.	Forma redonda, hiladas y contorno grueso.	
QVD-10	Plomo	Plomo con centro crema	Colonia polvosa, forma irregular, plana, extendida, margen lobulado, superficie plegada crecimiento no solo en los puntos de siembra y consistencia blanda.	Forma redonda, lisa y contorno fino.	
MUESTRA VI: AGUAS RESIDUALES					
QVID-07	Blanco con superficie café.	Blanco con centro café.	Colonia lanosa, forma filamentosa, elevada, sin margen, superficie con surcos radiados, crecimiento invasivo en toda la placa y consistencia blanda.	Forma ovalada y rugosa.	
QVID-18	Verde.	Crema.	Colonia granulosa, forma irregular, plana, extendida, margen rizoide, crecimiento no solo en los puntos de siembra, producción de exudado y consistencia seca y mucoide.	Forma redonda y lisa.	

Fuente: Propia

Anexo 21. Tabla de caracterización morfológica macroscópica y microscópica de los hongos filamentosos aislados en los planteles mineros.

Código	Características morfológicas de hongos de filamentosos				Observación microscópica
	Observación macroscópica			Forma de esporas	
	Color del cultivo en placa		Apariencia del micelio		
Anverso	Reverso				
MUESTRA I: LODO EN DIQUE DE COLA					
MID-06	Gris con blanco.	Crema con centro más intenso.	Colonia polvosa, forma circular, plana, extendida, margen entero, crecimiento limitados en los puntos de siembra, producción de exudado y consistencia blanda y mucoide.	Forma redonda y lisa.	
MID-07	Blanco.	Blanco con centro crema.	Colonia algodonosa, forma irregular, elevada, extendida, margen desflecado, superficie con surcos radiados, crecimiento limitado a los puntos de siembra y consistencia blanda.	Sin observación.	
MUESTRA III: COLA O LAMA FRESCA					
MIID-08	Crema y pigmentación amarilla difusible en el medio.	Crema con centro amarillo.	Colonia lanosa, forma filamentosa, elevada, sin margen, superficie con surcos radiados, crecimiento invasivo en toda la placa y consistencia blanda.	Forma oval alargada y lisa.	
MIID-09	Blanco con superficie negra	Gris con centro crema	Colonia lanosa, forma filamentosa, elevada, sin margen, superficie con surcos radiados, crecimiento invasivo en toda la placa y consistencia blanda.	Forma ovalada y rugosa.	
MIID-10	Crema y pigmentación amarilla difusible en el medio.	Crema con centro amarillo.	Colonia lanosa, forma filamentosa, elevada, sin margen, superficie con surcos radiados, crecimiento invasivo en toda la placa y consistencia blanda.	Forma oval alargada y lisa.	
MIID-14	Café rojizo, contorno blanco y pigmentación rojiza difusible en el medio.	Café rojizo, contorno naranja y pigmentación rojiza difusible en el medio.	Colonia algodonosa, forma circular, plana, extendida, margen filamentosos, superficie con surcos radiados, crecimiento limitado a los puntos de siembra y consistencia blanda.	Forma fusiforme.	

Continuación Anexo 21

Código	Características morfológicas de hongos de filamentosos					Observación microscópica
	Observación macroscópica					
	Color del cultivo en placa		Apariencia del micelio	Forma de esporas		
	Anverso	Reverso				
MIVD-04	Negro con contorno blanco.	Crema con negro.	Colonia polvosa, forma filamentosa, plana, extendida, margen filamentosos, superficie cerebriforme, crecimiento.	Forma ovalada y lisa.		
MUESTRA IV: COLA O LAMA VIEJA						
MIVD-05	Blanco con superficie café.	Crema con centro más oscuro.	Colonia lanosa, forma filamentosa, elevada, sin margen, superficie con surcos radiados, crecimiento invasivo en toda la placa y consistencia blanda.	Forma ovalada, rugosa y contorno grueso.		
MIVD-06	Verde y contorno blanco.	Crema con centro más oscuro.	Colonia polvosa, forma circular, plana, extendida, margen entero, crecimiento no solo en los puntos de siembra, producción de exudado y consistencia blanda y mucoide.	Forma redonda y lisa.		
MIVD-07	Negra y contorno crema.	Crema con centro más oscuro y gris.	Colonia polvosa, forma circular, plana, extendida, margen desflecado, superficie cerebriforme, crecimiento no solo en los puntos de siembra y consistencia blanda.	Forma redonda, hiladas y contorno grueso.		
MIVD-08	Verde con blanco.	Crema con centro más oscuro.	Colonia algodonosa, Forma circular, plana, extendida, margen, margen desflecado, crecimiento limitado a los puntos de siembra y consistencia blanda.	Forma redonda y lisa.		
MUESTRA VI: SEDIMENTOS DE DRENAJE						
MVID-04	Verde con contorno blanco.	Crema verdoso	Colonia polvosa, forma circular, plana, extendida, margen entero, crecimiento limitado a los puntos de siembra, producción de exudado y consistencia blanda y mucoide.	Forma redonda y lisa.		
MVID-05	Crema y pigmentación amarilla difusible en el medio.	Crema con centro amarillo.	Colonia lanosa, forma filamentosa, elevada, sin margen, superficie con surcos radiados, crecimiento invasivo en toda la placa y consistencia blanda.	Forma redonda y lisa.		
MUESTRA VII: SUELO DE COLAS						
MVIID-04	Blanco con naranja.	Crema con centro amarillo.	Consistencia lanosa, forma filamentosa, elevada, extendida, sin margen, con surcos radiados, crecimiento invasivo en toda la placa, y consistencia blanda.	Forma ovalada y lisa.		

Continuación Anexo 21

Código	Características morfológicas de hongos de filamentosos					Observación microscópica
	Observación macroscópica					
	Color del cultivo en placa			Apariencia del micelio	Forma de esporas	
	Anverso	Reverso				
MVIID-05	Blanca con naranja.	Crema con centro rojizo		Consistencia polvosa, forma circular, plana, extendida, margen entero, crecimiento no solo en los puntos de siembra y consistencia blanda y mucoide.	Forma ovalada y lisa.	
MVIID-13	Blanco con superficie café.	Crema con centro más oscuro.		Colonia lanosa, forma filamentosa, elevada, sin margen, superficie con surcos radiados, crecimiento invasivo en toda la placa y consistencia blanda.	Forma ovalada, rugosa y contorno grueso.	

Fuente: Propia

Anexo 22. Secuencias corregidas y alineadas de las bacterias identificadas por vía molecular en formato FASTA.

Secuencia 1. Cepa QIVB-10 (*Proteus penneri*)

>1_27F

```
GGGGAAGGGGGGGGGGCTAAACATGCAGTCGAGCGGTAACAGGAGAAAGCTTGCTTTCTTGCTGACGAGC
GGCGGACGGGTGAGTAATGTATGGGGATCTGCCGATAGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAAT
ACCGCATGACGTCTACGGACCAAGCAGGGGCTCTTCGGACCTTGCCTATCGGATGAACCCATATGGGAT
TAGCTAGTAGGTGAGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCTCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACA
CTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGC
CTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGT
GATAAAGTTAATACCTTTATCAATTGACGTTACCCGCGAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCG
CGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCGAGCGGTCATTAAGT
CAGATGTGAAAGCCCCGAGCTTAACCTTGGGAATTGCATCTGAAACTGGTTGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGG
GGTAGAATTCCACGTGTACCGATGAAATGCGATAGATATGTGTAAAGCATTGGACTAGTACGGACTCTCATC
CTGGTTAGAGACACACACTTACGCGACTAAATGCCCTGCTTATCCACAGGGTACACCCTGTCCACACGGGT
CTTTCCTGCACTATCTATACGTATTTCAACGCTTACCGCGTGAATAATTCATCGCCTCCCTCAACACAGACTTC
TACACTACCCACTTGTGAGGAAGTAGATTCCGCGACGCTAAAGCTTCAGGTGTATTTAAGATGTTGTACTTTAA
ATTACCACGGCAGGGGGATCGTTATTTTACCCTTCTGATAATTTTCCGGAAATAACGCCTTTAGGAACCCCTTT
TGTTATTTTCTTGGGAAATTTCTGTGCGAAAGGGTTTTTGGAAACAGGGTAGGCTTTTCCCCCTTGGG
GGGAAAAAACCCCTTTAATTTTGGGAATGAGGGTTGCCATTAGACCTTTTTCCGCCCCCCCCCTTCCCCCCC
CTCCGGTTAAAAAAAGGCTTTTGGTTTTTAAAGGCCCCCCCCCCAAAAACGGTCAATTTCTGTTAACCAACCCC
TTAAAGCCCGGGTATTGGGTTTTGGTCCCAACCCGGGGGGAATTTGCGCCCCCCTGTAAATTCGGTTAA
AAAAAAAGATACTTCCCCAAGGGGGGTGGGGCGTTTGACCCTACCCCCGGGAGGAAAAAGGAAAG
ATGTGGGCGGGGGGGGGGCCCAAGGGGGAACCTCCCTCCCACCAAAAGGCCCCCCAGGGGGGGGGGT
GGGGGGGCCCCATATATTACCCACCTCCCCCTCTCTTCTCCCGGGGGACCCCCAACACCCCCCTGGGGG
ATAAATGGGGGTATTTTTCCCCGGGGGGGCGCGCTTTTAAAGGGGAGGGGAGAAAAAGACTTCATTTTTTG
CCACCCCCCTTCCCCCTTTTTTCCCAAGAAAAGTTTATTCCACTCCCCCGGGGGTAAAAAAAATGGGG
TTTTAAAAAACTCGCCCGCTAAAAAAGGGGGGGCCAAAAACGCGGGGCGGGAATAAAGAGACAAAAACC
CCCCTCCTTTGTTTTTCTCTCTTGGGGTACCCCCAAAAAGAAAAAATGCCCCCAAGAAGGGGTTTTTT
TTTTAAAAATCCTCCCAAGGGGGTTTTTAACCCGGGGAATTTTGGGCCCCCCCCCCCGCGGTCTTATAAAA
GGGGTGGCCGCGAAGGGGGACCCCTTAAATAAAAAAACACCTCTCCCCCCCCCGGGGCGCGCCCCCAC
CGGGGGGGAAAAAAGGGGGGAGAAAAAATAATAATTATTTCTCGTTGGCCTCCCTTTTTACCTCCCTGG
GGGAAAGTGGGTGGGCTCTTTAGGGC
```

Secuencia 2. Cepa QIIE-11 (*Enterobacter sp*)

>3_27F

```
GGAAGGGGGGGGGGCTACCATGCAGTCGAGCGGCAGCGCGGGGTACCTGGTTCCTTGGCCGCGAGCGGC
AGAGGGGTGAGTAATGTCTGGGACACTGCCTGATGGAGGGAGATAACTACTGGAAACGGTATCTAATACCG
CATAACGTACACAAGACCAAGAGGGGGACCTTCGGGCTCTTGCCCTCATATGTGCCAGATGGGATTATC
TAGTAGGGGGGGTAACGGCTCACCTACGCCACTATCCCTATCTGGTCTGAGAGGATGACCACCCACTCTGG
AACTGACACACGTCACACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAGTGGGCGCAAGCCTGA
TGCACCCGTGCCGCGTGTATGAAGAAGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTTCAGCGGGGAAGAAGGTGTTGA
GGTTAATAACCTCAGCGATTGACGTTACCCGCAAAAAAGCCCCGGCTAACTCCGTGCCAGCCCCCGCGGT
AATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCAAAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCGCGCGGTCTGTCAACTCAGA
TGTGAAATCCCCGGTCTAACCTGGGAACCTTTCAAAACTGGCGGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGTA
AAATCCGTGTGTAGCGGAGAAGTGCATAGATATCTGGAAGAATACCTGTGGAGAGCGCGCCCCGTGGAC
AAACTGACTCTCGTGTGCGAAAGCGTGAGAACAAACGAGATTATATCCCGTGGTACCCACCCCATAA
AATATGTCCACTTGGAGGGTGTCTCTGTGACGCGTGTTCAGATCTCACGCGATAACTACACCGCGTGG
GAGAGTACGGCCCGCGGGGATAACACTCATATGAATGTGACGGGGGGCGCGCACAAGCGGGAGAGCGTG
TGGTTATATTCTCTATGCCACGCAAGAACTCTATCTCTACTCGTGACCTCCAGAGAACTTCTCCAGATATG
GTATGTGGGTGCCTCTCGGAACACTCAGACACCTGCGCTGGTGTGTCTCTCATCTCGTGTGTAAAGTG
TGTGGGTTTAAAGTCCCGAAACGAGCGACACCTTTTCAAACTTGTGACGCGGTTTCAGCGCGGAAACATCA
AAAGGAGATCTGCAGGTATACTGGAGAAAGGGGAATAACTCAGATCTTCTGTGCCCTTCAGATGAGGTAA
CGGGTCTCTAATGCGCGGCTTCGAGGAGAGACGACACGTG
```

Secuencia 3. Cepa QIII-E-16 (*Klebsiella* sp)

>3L_27F

GGGAATTGGGGCGGCTACACATGCAGTCGAGCGGTAGCACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGCGGC
GGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAACTGCCTGATGGAGGGGGATACTACTGGAAACGGTAGCTAATACC
GCATAACGTCGCAAGACCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCCTCATGCCATCAGATGTGCCCAGATGGGATTA
GCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACAC
TGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAAATGGGCGCAAGCC
TGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGGGGAGGAAGGCG
ATAAGGTTAATAACCTTGTGCGATTGACGTTACCCGCGAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCG
CGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCGAGCGGTCTGTCAAG
TCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTGCAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGG
GGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCC
CTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC
GCCGTAAACGATGTGCGATTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAATCGAC
CGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCA
TGTGGGTTTAATTCGATGCAACGCGGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCACAAGAACTTTCAGAGATG
GATTGGTGCCTTCGGGAAGTGTGAAAACAGGTGCTGCATGGGCTGTCGTCCGCTTCGGTGTTGTGAAAAATG
TTGGGTTAAGTCCCGCAACGAAGCGCAACCCTTTATCCCTTTGTTGGCCAGCGGGTTAGGGCCGCGGGA
ACTCAAAGGAAAACTGCCCATGGATAAACTGGAAGGAAAGGGGGGGGATGAACGTCCAAGTCCTTCATG
GGCCCTTTACAACCAAGGGGTTAACCCCGTGGCTTTAAATGGCTTTTTTCCAAAAAAAAGCCAACCCCC
CCGAAGAA

Secuencia 4. Cepa QIII-B-10 (*Staphylococcus aureus*)

>5_27F

TGCAGTCGAGCGAACGGACGAGAAGCTTGCTTCTCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGA
TAACCTACCTATAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAATATTTTGAACCGCATGG
TTCAAAAGTGAAAGACGGTCTTGCTGTCACTTATAGATGGATCCGCGCTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAA
CGGCTTACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAATGAGACACGGT
CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCCGC
GTGAGTGATGAAGGTCTTCGGATCGTAAACTCTGTTATTAGGGAAGAACATATGTGTAAGTAAGTGTGCAC
ATCTTGACGGTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCA
AGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGG
CTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAGCTGGAAGCTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCCATGTGTAG
CGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACGCTG
ATGTGCGAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGCTAAACGATGAGTGCTAA
GTGTTAGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGACGCTAACGCAATTAAGCACTCCGCTGGGGGAGTACGACC
GCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGACCCGCAACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAA

Secuencia 5. Cepa MIII-A-01 (*Bacillus cereus*)

>6_27F

CGGGGGGGGGGGCTATACATGCAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGA
CGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGG
ATAACATTTTGAAGTGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCG
CATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGC
CACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGCAATGGACGA
AAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAGGCTTTTCGGGTGCTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAA
CAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGTTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGC
AGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCT
TAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAGCTGGGAGACTTGAGTGCAGAAG
AGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGA
CTTTCTGGTCTGTAAGTGCAGTGAAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC
CACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCA
CTCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGG
AGCATGTGGGTTAATTGAAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGAAAACCTAGAGAT
AGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGCTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTG
GGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGATCTTAGTTGCCATCATTAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTG
CCGGTGACAAACCGGAAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGGCCCTTATGAACCTGGGCT

Secuencia 6. Cepa MIIA-03 (*Pantoea* sp)

>7_27F

GGGCTACCATGCAGTCGAGCGGTAACGGAGGTGCTTGGTCCCTTTTGTGCGAGAGCGGCAGAGGGGAGAAT
TGTGTGGGGAACCTCTGCGAGATGGGGGAGATCTCTAGTGAGAGGGTCTCTTACACCGCAAAGTCTCAC
GAGACCAAAGAGGGACATCTTCGCCTCTCGCGCCCTCATATGTGCCCATATGATATTATCTTATGTGGGGG
GTAATGTCTCTCTGCGACAATATCCCTCTGTGGTCAGAGAAGAAGACCCCCCACTGTGAATGTGACACGG
TCCCCACACTCCTAGGGGGGGCCACTGTGGAATTTTGCAGTGTGCGCGCACCCGAGATGCCCCCGTGC
CGCGTGTAAAAAAGCGTCTTCGTTGTGTAGTACTTTTTCCGCGGAGAAGAGGGTTTAGATGTTTATCTCT
CCGCTAGTGATTTTCCCCACAAAAACACCCCCGAAATCTCCGTGCCCCACCCCGCGGATATAGAGAGGGG
GCGCGTTTTTCTCAAATTTAGTGCGTATAACGCACACACGCGCTCTGTGTTATCTCATATGTGATCTCCGGG
GTCTTACTGTGAAAACGCTTTTAACTGTGGCGC

Secuencia 7. Cepa QIVC-05 (*Enterobacter* sp)

>7L_27F

CATGCAGTCGTACGGGGTACCCGTAACCTTTGTCTCGGGTGAGAAGCGGGGGACAGGTGAGTGATGTGTGG
GGGACTGTGTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTGCGACGACCCAA
GAGGGGGACCTTCTGGCCTCTTGCCATCACATGTGCCCCATGGGATTATCTAGTAGGTGGGGTAACGGCT
CACCTATGCGACAATACCTATCTGGGCTGAGAGGATGACCCCCCACTGTAACTGAGACACGGTCCCCAC
TCCTACGGGAGGCGCCAGTGGGGAATATTGTCAATGGGCGCAAGCCTGATGCACCCCTGCCGCGTGTGT
GAAAAAGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCTCGGGGAGAAAAAGTGTGTGGTTAATAACCTCTCCGATTG
AGGTTTCACGCACAAAAACACCGGCTATCTCTGCCCCACCCCGGGGAATATAGAGGGTGCAGCGCTT
TTTCTCAATTTCTGGGCGTAAACGCACGCACGCGTCTGTCTCGTCTCATATGAAATCCCCCGGTCTCCC
TGTGAACGCGTTCGAACTGGGACGCTATAGACTCGTGTAGAGGGGGAGAATTTTCCGTGTGTGCGGTGAA
ATGCGTATAGATCTGGAGGAATATCCGTGGCGAAAGCGGCCCCCTGTACAAAAACAGACACTCTCGTGCGA
AAACGTGGGGAGCAAAACGATTATATACCCCGGGATTCCCCGCCCAAACAATATCTACTTGTAGGTTGTG
CCCCTTAGGCGTGGGTTTCCCCAGATATAACGTTTAACTACCCCGGGGAGAACACCCCCAAGGTTAA
AATCTAATGAATTTTTCGGGGG

Secuencia 8. Cepa MIVC-13 (*Enterobacter* sp)

>8L_27F

AGTCGAACGGTAACAGGAAGCAGCTTGCTGCTTTGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGA
AACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTGCGAAGACCAAAGAG
GGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCGGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCA
CCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACT
CCTACGGGAGGCGAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATG
AAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGATAAGGTTAATAACCTTGTGCGATTG
ACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGT
TAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGCGGCTGTGCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAA
CCTGGGAACGTCATTGCAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGT
GAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTTGACAAAGACTGACGCTCAGGT
GCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTTGGAG
GTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAG
GTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCGCAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGATGCAACGCG
AAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTTAGCAGAGATGCTTTGGTGCCTTCGGGAACCTCTGAGAC
AGGTGCTGCATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCAGAACGAGCGCAACCCCTT
ATCCTTTGTTGCCAGCGGTTCCGGCCGGGAACCTCAAAGGAAAA

Secuencia 9. Cepa MIVB-02 (*Terribacillus saccharophilus*)

>9_27F

ACCAGATGACCCCTTCGGGGTGATTCTGGTGGAATGAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCT
GCCTGTAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAGTATTTCTTTCTCTGATTGGAA
ATGGAAAGACGGTTTCGGCTGTCACTTACAGATGGGCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGC
CCACCAAGGCGACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCA
GACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTAGGGAATCTTCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTG
AGCGATGAAGGCCTTCGGGTCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACGAGAGTAAGTGTCTGTAC
CTTGACGCTACCTAACCAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAA
GCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGTAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACAGC
TCAACTGTGGAGGGTCATTGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGC
GGTGAAATGCGTAGATATGTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGA
GGAGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAG

GTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCG
CAAGGCTGAAACTCAAAAGAATTGACGGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAA
CGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCGCTGACAATCTTGAGAACAAAGACGTTCCCTTCGGGGACAG
CGTGACAGGTGGTGCATGGTT

Secuencia 10. Cepa MVIB-02 (*Exiguobacterium aurantiacum*)

>11_27F

GTCGAGCGCAGGAATCATCCGAACCCCTTCGGGGGACGTTGATGGAATGAGCGGCGGACGGGTGAGTAA
CACGTAAAGAACCTGCCCTCAGGTCTGGGATAACCACGAGAAATCGGGGCTAATACCGGATGGGTGCATCG
GACCGCATGGTCCGAGGATGAAAGGCGCTTCGGCGTCGCCTGGGGATGGCTTTCGGGTGCATTAGCTAGT
TGGTGGGGTAATGGCCACCAAGGCGACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGA
CTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATG
GAGCAACGCCCGCTGAACGATGAAGGCCTTCGGGTCTGTAAGTTCTGTTGTAAGGGAAGAACAAGTGCCG
CAGGCAATGGCGGCACCTTGACGGTACCTTGCAGAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT
AATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGCCTCTTAAGTCTGA
TGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGCCATTGGAAACTGGGAGGCTTGAGTATAGGAGAGAAGAGT
GGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAAGTGCGAAGGCGACTCTTTGG
CCTATAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCG
TAAACGATGAGTGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGAAGCTAACGCATTAAGCACTCCGC
CGGGGGGAGTACGGTCGCAAGGCTGAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGACCCGACAAGCGGTGGGA
GCATGTTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGGAAGAACCCTACCAACTCTTGACATCCCCCTGACCCGGGTAC
AGAGAATGTAACCTTCCCCTTTCGGGGGGCCAGGGGTGACCAAGGTGGTGGCATGGGTTGTCCGTGAGCC
TTCGTGTCCGTGAAAAATGTTTGGGGTTTAAAGTTCCCGCCAACGGAAGCGCAAACCCCTTGCTCTCTTAGTT
TGCCACCAATTTTCAGTTTGGGGCAACTCCTAAAGGGAAAACTGGCCCGGT

Secuencia 11. Cepa QVIE-17 (*Bacillus cereus*)

>13_27F

CTATACATGCAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACA
CGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAAC
CGCATGGTTGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTG
GTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTG
AGACACGGCCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAG
CAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCTGTAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTG
AATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAAGCAAGCCAGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATA
CGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTG
AAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAGTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAA
TTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAAGTGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGT
AACTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAAC
GATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGG
GAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTT
AATTGGAAGCAACGCGAAGAACCCTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCT
TCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGTTGTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGGTTAAGTCCC
GCAAC

Secuencia 12. Cepa MIVB-11 (*Bacillus cereus*)

>19_27F

GTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACC
TGCCCATAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCATGGTTCCG
AAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACG
GCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCC
CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCG
TGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCTGTAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGC
ACCTTGACGGTACCTAACCAAGCAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGC
AAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACG
GCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAGTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAATTCATGTGTA
GCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAAGTGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACGTGACACTG
AGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTA
AGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCG
CAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCA
ACGCGAAGAACCCTACCAGGTCTTGACATCCTCTGAAAACCCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAG



AGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGC
AACCCTTGATCTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAG

Secuencia 13. Cepa MVIIB-08 (*Bacillus* sp)

>20_27F

CGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAATGGGATTAAGAGCTTGCTCCTTATGAAGTTAGCGGCGGAC
GGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGA
TAACATTTTGAACCGCATGGTTGCAAAATTGAAAGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCG
CATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGC
CACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGA
AAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTGCTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAA
CAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGC
AGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCT
TAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGATTGCAAAAA
AGGAAAGTGAAATTCATGTGTACCGGTGAAATGCGTAAAGATATGAAGAAACACCATTGGCAAAGGCAACT
TTCTGGTCTGTAAGTACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAATACCCTGGTAGTCCA
CGCCGTAAACAATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACT
CCGCCCGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGA
AGCATGTGGTTTAATTTCAAAGCAACGCGAAAAACCTTTACCAAGGTCTTGACATCCCTCTTGAAAACCTT
AAAAAATAAGGGCTTTCTCCCTTCCGGGAGCAAAAGGGAAAAGGGGTGGCAAGGGTTTTCTCCACCT
CCTGGTCTTGAAAAAATTTGGGGTTAAATCCCCCAACAAAAGGGCAAACCTTGGAATCTTAAATTGG
CCCCCTTTAAATTTGGGGCCCCCTTAAGGGGGAATCCCCCGGGGAAAAAACCCCGAGGAAAAAAG
GGGGGGGGGAAAAAGGCCAAAAAATCCTTTGGCCCCCTTTAAACCGGGGGGGGTAAAAAACCCGGG
TTTCAA

Secuencia 14. Cepa QIIIB-09 (*Escherichia* sp)

>21G2_27F

GTCGAACGGTAACAGGAAACAGCTTGCTGCTTTGCTGACGAGTGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAA
ACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGG
GGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCGGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCAC
CTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTC
CTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGATGA
AGAAGCCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTACGCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTCATTGA
CGTTAGCCGAGAGAAGCACCAGGCTAATCCGTGCCAGCCGCGGTAATACGAGGGGTGCAAGCGTT
AATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCGAGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAATCCCCGGGCTCAAC
CTGGGAAGTGCATCTGATACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGA
AATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGC
GAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTGACTTGAGAGGT
GTGCCCTTGAGGCGTGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTT
AAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGGCCCGCACAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAG
AACCTTACCTGGTCTTGACATCCACGGAATTTTACAGATGGAAGGTGCCTTCGGGAAGTGTGAGACAG
GTGCTGCATGGCTGCTGAGCTCGTGTGTTGAAATGTTGGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTA
TCCTTTGTTGCCAGCGTCCGGGCCGGGAAGTCAAAGGAGAAGTGCCCGGTGATAAACTGGGAGGAAAGG
GGGGGGATGAACGTCCAAG

Secuencia 15. Cepa QVIB-08 (*Klebsiella* sp)

>23G5_27F

GTCGAGCGGTAGCACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAA
CTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAACGGTAGCTAATACCGCATAATGTCGCAAGACCAAAGTGGG
GGACCTTCGGGCCTCATGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACC
TAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCC
TACGGGAGCGAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAA
GAAGGCCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTACGCGGGGAGGAAGGCGGTGAGGTAAATACCTTGTGATTGAC
GTTACCCGAGAGAAGACCGGCTAATCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTA
ATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCGAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAATCCCCGGGCTCAAC
CTGGGAAGTGCATTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTG
AAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTG
CGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTGCAATTGGAGGT
TGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGT
TAAACTCAAATGAATTGACGGGGGGCCCGCACAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAA

GAACCTTACCTGGTCTTGACATCCACAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTGTGAGACA
GGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTA
TCCTTTGTTGCCAGCGGTTCCGGCCGGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGGAGGAAGGTGGG
GGAATGACGTCAAGTCATCATGGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTG

Secuencia 16. Cepa QVIA-12 (*Serratia marcescens*)

>24G1_27F

TGCACGTCGAGCGGTAGCACAGGGGAGCGTTGCTCCCTGGGTGACGAGCGGGCGGACGGGTGAGTAATGT
CTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACC
AAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAAT
GGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTC
CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCG
TGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGAGGAGGAAGGTGGTGAACCTAATACGTTTCAT
CAATTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGC
AAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCGAGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCCGG
GCTCAACCTGGGAACTGCATTTGAAACTGGCAAGCTAGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGTA
GCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACGAAGACTGACGC
TCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTCGATT
TGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCC
GCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCGCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCA
ACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCT
GAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAA
CCCTTATCCTTTGTGCCAGCGGTTCCGGCCGGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGGAGGAAG
GTGGGATGACGTCAAGTCATCATGGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGGCTACAATGCGGTTTACA
AAGAGAAGACGACCTCGCCGAGAGCAAGCGGACCCCTTAAAAAACTTCCCAATCCCCGATTGGAATCTGCC
ACCCACCCCCCGAAATCGGAATCCCCGTAAACCCGAAAAAAAAGCTACGGGGAAAAAATTTCCCGGG
CTTTTTAAACCCCCCGGTAC

Secuencia 17. Cepa QIIE-10 (*Serratia marcescens*)

>25_27F

ACATGCAAGTCGAGCGGTAGCACAGGGGAGCGTTGCTCCCCCTGGGTGACGAGCGGGCGGACGGGTGAGTA
ATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAA
GACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGG
TAATGGCTACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAACGATG
GGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGC
CGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGAGGAGGAAGGTGGTGAACCTAATACGT
TCATCAATTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGG
GTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCC
CCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTTGAAACTGGCAAGCTAGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTCAG
GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACGAAGACTG
ACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTC
GATTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTAC
GGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCGCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGA
TGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAA
CTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGC
GCAACCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTTCCGGCCGGG

Secuencia 18. Cepa QIA-13 (*Pseudomonas aeruginosa*)

>26G8_27F

GGGAATTGGGGCGGCTACACATGCAGTCGAGCGGATGAAGGGAGCTTGCTCCTGGATTACGCGGCGGAC
GGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGTCCGGAAACGGGCGCTAATACCGCAT
ACGTCCTGAGGGAGAAAGTGGGGGATCTTCGACCTACGCTATCAGATGAGCCTAGCTCGGATTAGCTA
GTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGA
ACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGAT
CCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAA
GTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCAACAGAAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAA
TACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTTCAGCAAGTTGGATG
TGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAATACTGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGGA
ATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACCACTGGACTG
ATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAAC

GATGTGCTAGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTCGACCGCCTGGG
GAGTACGGCCGCAAGGTTAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTT
AATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGCTGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCC
TTCGGGAACCTCAGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG
TAACGAGCGCAACCTTTGTCCTTAGTTACCAGCACCTCGGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACA
AACCGGAGGAAGGTGGGGATGAACGTCAAGTCATCATGCGCCCTTACGGGCCAGGGCTACACACGTGCT
ACAATGGTTCGTAACAAAGGGTTGCCAAGCCCCCGAGGTGGAGCTAATCCATAAAAACCGATCGTAGGT
TCCGGATCCCAGT

Secuencia 19. Cepa MVIIA-01 (*Bacillus* sp)

>27AV2_27F

ATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACG
TGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTGAACCG
CATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGT
GAGGTAAACGGCTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAG
ACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGACAGTAGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCA
ACGCCGCGTGAGTGATGAAGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTCGAA
TAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
GTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGA
AAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACCTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAT
TCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGT
AACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAAC
GATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAAGCACTCCGCCTGGG
GAGTACGGTCGCAAGACTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCAAGCGGTGGAGCATGTGTTTT
AATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCT
TCGGGGGCGAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG
CAACGAGCGCAACCTTTGATCTTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAA
CCGGAAGAAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGGCCCCCTATGAACCTGGGGCTACACACGTGGCTAC
AATGGGACAGAAACAAAGGGGAGCCGGA

Secuencia 20. Cepa QIIC-13 (*Pseudomonas* sp)

>D_27F

CTCAGGTAAGGTCCGTAACAATGGTTAACCCGGTATTAGTGCTGGATGCGTCGGGGTTTCAAGTAAATTG
CGCTAACGCAGTGCTAGCCCTGGGGTAGTGGGGGGGATAACGGTTCCCGGAAACGGGGCGCCTAATATC
CCGCATACGGATCCTGGAGGGGAGAAAGTGGGGGAATCTTCCGGAACCTCACCGCTATCAGAATGAGCCT
TAAGGTCGGAATTAGCTAAGTTTTGGGTGGGGTTAAAGGGGCCTACCAAAGGGCGAAACGATCCGTTAAC
TGGGGTCTGAAAGAGGATGATCAGGTCACACTGGGAAGTGGAGACCACGGGTCCAGACTTCCCTACGGGG
GAGGCAGGCAGTGGGGGGAATATTTGGGACAAATGGGGCGAAAAGCCCTGGATCCAGGCCCATGGCCCCG
GCGTGGGTGTGAAAGAAGGGGTCTTCGGGAAATTGTAAAAGGCAACTTTAAAGTTGGGGGGAGGAAGGGG
CAAGTAAGTTTAATAACCTTGCTGTTTTGACGTTACCAAACAGGAATAAGGCACCGGGCTAACTTTCTGT
GCCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAAGGGGTGCCAAGCGTTTAACTCGGGAATTTACTGGGGCGTAAAGC
GCGCGGTAGGGTGGTTTCAGCCAAGTTTGGGATGTTGAAAAATCCCCGGGGCTCAACCTTGGGGAAGTGG
CATCCCAAAACTACCTGAAGCTAGAAGTACGGGTAGAAGGGGTGGGTGGGAATTTTCTGTGGTAGCGGG
TGAAAATGCCGTAGAATATAGGGAAGGAAACACCCAGTGGGCGAAAAGGCGAACCACCTGGGACTGGATA
CTGGACACTGAAGGTGCGAAAAGCCGTGGGGGAGCCAAACAGGGATTAGAATACCCCTGGGTAGTCCAC
GCCCCGTAAAACGAATGTGCAACTAGCCCGTTGGGGATCCCTTGAGAATCTTTAGTGGGCGCCAGCTTAACG
CCGATTAAGTTGGAACCGCCCTGGGGGAAGTACGGGCCGCAAGGGTTAAAACTCAAATGGAATTGAAC
GGGGGGCCCCGCACAAAGCGGGGGGAACCATGGTGGTTTTAATTTCAAGGCCAACGCCGAAAAAAACCT
TTACCCGGGCCCTTGGACATGGCTGAAAAAACTTTTCCCAAAGATGGA

Secuencia 21. Cepa QVD-21 (*Enterobacter* sp)

>F_27F

GTGCAACGGTAGCACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAAC
TGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGG
GGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCT
AGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCT
ACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGATGAAG
AAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTACGCGGGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAACCGCAGCAATTGACG
TTACCCGCAGAAAGACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAA
TCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACC

TGGAACTGCATTGCAAACCTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGA
AATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGC
GAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTGACTTGGAGGTT
GTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTT
AAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGGCCGCAACGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAA
AACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACCTTCCAGAGATGCTTTGGTGCCTTCGGGAACCTGAGACAGG
TGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGGTTAAGTCCCGCAACGAGC

Secuencia 22. Cepa QVD-20 (*Enterobacter cloacae*)

>G_27F

GTGCAACGGTAGCACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAAC
TGCCTGATGGAGGGGATAACTACTGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTGCGAAGACCAAAGAGGG
GGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCT
AGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCT
ACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAG
AAGGCCCTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAACCGCAGCAATTGACG
TTACCCGCGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGAAGCGTTAA
TCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACC
TGGAACTGCATTGCAAACCTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGA
AATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGC
GAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTGACTTGGAGGTT
GTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTT
AAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGGCCGCAACGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAG
AACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACCTTAGCAGAGATGCTTTGGTGCCTTCGGGAACCTGAGACAGG
TGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTAT
CCTTTGTTGCCAGCC

Secuencia 23. Cepa QIA-02 (*Pseudomonas aeruginosa*)

>H_27F

GGGCGGGCTACACATGCAGTCGAGCGGATGAAGGGAGCTTGCTCCTGGATTACGCGGCGGACGGGTGAG
TAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGTCCGGAACGGGCGCTAATACCGCATACGTCCTG
AGGGAGAAAGTGGGGGATCTTCGGACCTCACGCTATCAGATGAGCCTAGGTTCGGATTAGCTAGTTGGTGG
GGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAACCTGAGACA
CGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATG
CCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACC
TTGCTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGG
GTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTCAGCAAGTTGGATGTGAAATCC
CTGGGCTCAACCTGGGAACCTGCATCCAAAACCTACTGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAATTTCTG
TGTAAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCACTGGCGAAGGCGACCACTGGACTGATACTGA
CACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTC
GACTAGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGCGCAGCTAACGCGATAAGTCGACCGCCTGGGGAGTAC
GGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGGCCGCAACGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGA
AGCAACGCGAAGAAACCTTACCTGGGCCTTGACATGCTGAGAACTTTCCAGAGAATGGATTGGTGCCTTT
CGGGAACCTCAGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTA
ACGAGCGCAACCCTTGCTTAGTTACCAGCACCTCGGGGGGGGCACTCTAAGGAACTGCCGGGGGACAA
ACCGGAGAAAGGGGGGATGAACGTCAAGTCATGCGGCCCTTAACGGCCAGGGGTTACCCACGTGGCT
ACAAAGGGTCGGGTAACAAAGGGTTGCCCAAAC

Secuencia 24. Cepa QIII-12 (*Escherichia coli*)

>I_27F

ACACATGCAGTCGACGGTAACAGGAAACAGCTTGCTGTTTCGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGT
CTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTGCGAAGACC
AAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCGGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAAC
GGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTC
CAGACTCAATACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCCGG
TGATATGGAAGAGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCT
CATTGACGTTACCCGCGAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCA
AGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGG
CTCAACCTGGGAACCTGCATCTGATACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAG

CGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACGAAGACTGACGCTC
AGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTGCACTT
GGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCC
GCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCA
ACGCGAAGAACCCTTACCTGGTCTTGACATCCACGGAAGTTTTAGAGATGAAAATGTGCCTTCGGGAACCG
TGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCA
ACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTCCGGCCGGGAAGTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAA
GGGTGGGGATGAACGTCAAGTCATCATGGGCCCTTACGACCAAGGGGCTACACACGTGGCCTACAATGGG
GGCCGCATACAAAGAGAAGCGACCTCGCCGAGAGCAAGCGGGACCTCATAA

Secuencia 25. Cepa QVIE-11 (*Klebsiella pneumoniae*)

>K_27F

ATGCAGTCGAGCGGTAGCACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGG
GAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAATGTCGCAAGACCAAAG
TGGGGGACCTTCGGGCCTCATGCCATCAGATGTGCCAGTAGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCT
CACCTAGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGTGACCAACCACTGGAATGAGACAGCGTCCAGA
CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTG
TGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGTTAAGGTTAATAACCTTGGCGAT
TGACGTTACCCGCAAGAAGACACCGGCTAATCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGC
GTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCT
CAACCTGGGAACTGCATTGAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGATAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGC
GGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACAAAGACTGACGCTCA
GGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTGCAATTTG
GAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCGGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCCTGGGAGTACGGCCG
CAAGGGTTAAAACTCAAATGAAATTGACGGGGGCCCCGACAAAGCGGTGGGAGCATGTGGGTTTAATTCGA
TGCAACGCGAAGAAACCTTACCTGGGTCTTGACATCCACAGAACTTTTCCAGAAAATGGATTGGGTGCCTT
TCGGGGAACTGTGAAAAACAGGTGCTTGCATGGGCTGTCTTCAACCTCGTGGTTTGTGAAAATGTTTGGG
GTTAAAGTTCCCGCAACGAAGCGCAAACCTTTATCCTTTTGTGGCAGCCGGGTTAAGGCCGGGGAAC
TCCAAAGGAAAACTGGCCAGTGAATAAAT

Secuencia 26. Cepa MIIIB-04 (*Acinetobacter* sp)

>M_27F

TGCTTGCACTATCACTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGGAATCTGCCTATTAGTGGGGGACAACA
TCTCGAAAGGGATGCTAATACCGCATACGTCTACGGGAGAAAGCAGGGGATCACTTGTGACCTTGCGCTA
ATAGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCTGTAGCGGGT
CTGAGAGGATGATCCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGA
ATATTGGACAATGGGGGGAACCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTATGGTTGTAAAGC
ACTTTAAGCGAGGAGGAGGCTCTTTTGGTTAATACCCAAGATGAGTGGACGTTACTCGCAGAAATAGCACC
GGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGATTTACTGGGCGTAAAG
CGCGCGTAGGCGGCCAATTAAGTCAAATGTGAAATCCCCGAGCTTAACCTGGGAATTGCATTGATACTGG
TTGGCTAGAGTGTGGGAGAGGATGTTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAAT
ACCGTAGCGAAGGCAGCCATCTGGCCTAACACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCATGGGGAGCAAACAGGA
TTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGTCTACTAGCCGTTGGGGCCTTTGAGGCTTTAGTGCGC
CAGCTAACGCGATAAGTAGACCGCCTGGGGGAGTACGGGTGCGAAGACTAAAACTCAAATGAAATTGACG
GGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAAACCTTACCTGGGCC
TTGACATAGTAGAAAACCTTTCCAGAGAATGGATTGGTGCCC

Secuencia 27. Cepa MIIIC-07 (*Pseudomonas* sp)

>N_27F

GTCGAGCGGATGACGGGAGCTTGCTCCTTGATTACGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCC
TGGTAGTGGGGGACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGAC
CTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGTAATGGCTACCAAGGC
GACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGAAGACGGTCCAGACTCCTACGGG
AGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGT
CTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGCTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCG
ACAGAATAAGCACCGGCTAATCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAAT
TACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTTTGTAAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAAT
GCATCCAAAACCTGGCAAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG
ATATAGGAAGGAACACCAAGTGGCGAAGGGCACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTG
GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTG

AGATTTTGTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAA
TGAATTGACGGGGGGCCGACCAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCA
GGCCTTGACATGCAGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACCTGACACAGGTGCTGCATG
GCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCCTAACGAGCGCAACCCCTTGTCTTAGTTAC
CAGCACGTTATGGTGGGCACTCTAAGGAGATGCCGGTGACAAACCGGAGGAAAGGTGGGGATGACGTCA
AGTCATCATGGGCCCTTACGGCCTGGGCT

Secuencia 28. Cepa MIIIC-06 (*Bacillus sp*)

>O_27F

CAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAA
CCTGCCCATAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCATGGTT
CGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAA
CGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGG
CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCG
CGTGAGTGATGAAGGCTTTCCGGTTCGTAAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTG
GCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAAGTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTG
GCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCA
CGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAATCCATGT
GTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACCTGACA
CTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTG
CTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGGAGTACG
GCCGCAAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCCGACAAAGCGGGTTGGAGCATGTGGGTTTA
ATTCGAAAGCAACGCGAAGAAACCCCTTACCAGGCTTGGACATCCTTCTGAAAAACCCCTAGAAGATAGGG
GCCTTCTCCTTCGGGAAGCAGAAATGACAGGTTGGTTGCATGGTTTGGTTTCGTCGACCTCGTGTCCCTGAA
AATGTTTGGGGTTAAGTTCCCGCAAACGAGGCGCAACCCCTTTGATCTTAGTTGGCCATCCATTAAAGTTGG
GGCACCTCCTAAGGTTGAACTGGCCGGGTGAACAAACCCGGAAGGAAAGGGTGGGGGATGGACGGTCCA
AATCCATCATTGCCCCCTTTATGGAACCTGGGGCCTAAAAACCGGGGGCTAACAAATGGGAACCGGTACAA
AAAA

Secuencia 29. Cepa MIVB-01 (*Bacillus marisflavi*)

>P_27F

GTCGAGCGGATCGATGGGAGCTTGCTCCCTGAGATCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACT
GCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACACCTACCCCCGCATGGGGGA
AGGTTGAAAGGTGGCTTCGGCTATCACTTACAGATGGACCCGCGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAATG
GCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCC
CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCG
TGAGTGAAGAAGGTTTTCCGATCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTGCAATAGGGCGG
CGCCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAAGTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGG
CAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCA
GGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAATCCAAGTG
TAGCGGTGAAATGCGTAGATATTTGGAGGAACACCAGTGGCGAAAGCGACTTTCTGGTCTGTAACCTGACAC
TGAGGCGCGAAAGCGTGGGGGAGCAACAGGATTAGATACCCTGGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGT
GCTAAGTGTTAGAGGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGGAGT
ACGGTCGCAAGACTGAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGGTTTAA
TTCGAAGCAACGCGAAGAAACCTTACCAGGCTTGACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTTCCCC
CTTTCGGGGGACAGAGTGAACAGGTGGTGCCATGGGTTGTCGTTACGCTCGTGTGTTGAGATGTTTGG
GGTTAAGTCCCGCCAACGAAGCGCAACCCCTTTGGATCTTAGTTTGGCAGCAATTTAGTTTGGGGCACTCTT
AAAGATGACTGGCCG

Secuencia 30. Cepa MVIIC-03 (*Pseudomonas sp*)

>Q_27F

CATGCAGTCGAGCGGATGACGGGAGCTTGCTCCTTGATTGACGGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAA
TCTGCCTGGTAGTGGGGGACAACTTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATACGTCTACGGGAGAAAGCAG
GGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTGCGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACC
AAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCT
ACGGGAGGACAGAGTGGGGAATATTGGCAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGACCGCTGTGTGAAG
AAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGCTAATACCTTGCTGTTTTGACGT
TACCGACAGAATAAGCACCGGCTAAGTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATC
GGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTTCGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTG

GGAAGTGCATCCAAACTGGCGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTTCTGTGTAGCGGTGAAAT
GCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAA
AGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAA
TCCTTGAGATTTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAA
CTCAAATGAATTGACGGGGGCCCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAAC
CTTACCAGGCCTTGACATGCAGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACCTGACACAGGTG
CTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTC
TTAGTTACCAGCACGTTATGGTGGGGCACTCTAAAGGA

Secuencia 31. Cepa MVIA-01 (*Acinetobacter calcoaceticus*)

>R_27F

AGTCGAGCGGGGTGATGGGTGCTTGCTACTATCACTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGGAATCT
GCCTATTAGTGGGGGACAACATTTGAAAAGGAATGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGG
ATCTTCGACCTTGCGCTAATAGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAG
GCGACGATCTGTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCCAGACTCCTAC
GGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGCGGAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCTGTGTGAAGAA
GGCCTTATGGTTGTAAAGCACTTTAAGCGAGGAGGAGGCTACTTTAGTTAATACCTAGAGATAGTGGACGTT
ACTCGCAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCG
GATTTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGCGGCTAATTAAGTCAAATGTGAAATCCCCGAGCTTAACCTTGGG
AATTGCATTCGATACTGGTTAGCTAGAGTGTGGGAGAGGATGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGC
GTAGAGATCTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCATCTGGCCTAACACTGACGCTGAGGTGCGAAAG
CATGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGTCTACTAGCCGTTGGGGCC
TTTAGGCTTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTAAAACT
CAAATGAATTGACGGGGGCCCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTT
ACCTGGCCTTGACATAGTAAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACCTACATACAGGTGCTGC
ATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTTTCCTTATTT
GCCAGCGAGTAATGTGCGGAAACCTTTAAGGATACTGGCCAGTGACAACTGGGAGGAAGGCGGGGAACG
ACGTCAAGTCATCATGGGCCCTTACGGGCCAGGGCTACACACGTGGCTACAATGGTCCGGGTACAAAGGG
GTTGCTACCTAGCGATAGGATG

Secuencia 32. Cepa MVIB-07 (*Acinetobacter* sp)

>S_27F

CGAGCGGAGTGATGGTGCTTGCACTATCACTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGGAATCTGCCTAT
TAGTGGGGGACAACATCTCGAAAGGGATGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGATCACT
TGTGACCTTGCGCTAATAGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGA
CGATCTGTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCCAGACTCCTACGGGA
GGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGGAACCCTGATCCAGCCATGCCGCTGTGTGAAGAAGGCC
TTATGGTTGTAAAGCACTTTAAGCGAGGAGGAGGCTCTTTTGGTTAATACCCAAGATGAGTGGACGTTACTC
GCAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGATT
TACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGCGGCCAATTAAGTCAAATGTGAAATCCCCGAGCTTAACCTTGGGAATT
GCATTGATACTGTTGGCTAGAGTGTGGGAGAGGATGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG
AGATCTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCATCTGCCTAACACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCATG
GGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGTCTACTAGCCGTTGGGGCCTTTG
AGGCTTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTAAAACTCAAA
TGAATTGACGGGGGCCCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCT
GGCCTTGACATAGTAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAATCTACATACAGGTGCTGCATG
GCTGTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTTTCCTTACTTG
CCAGCATTTGCGATGGGGAACCTTTAAGGATACTGGCCAGTGACAACTGGAGGAAAGGGCGGGGACGAC
GTCCAAGTCATCATGGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACCGTGGCTACAATGGGTTCGGTACAAAGGGTT
GC

Secuencia 33. Cepa MVIC-08 (*Bacillus cereus*)

>T_27F

CTATACATGCAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACA
CGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAAC
CGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTG
GTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTG
AGACACGGCCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAG
CAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTGCTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTG
AATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACGAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA

CGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTG
AAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAGTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAA
TTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGT
AACTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAAC
GATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGG
GAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTT
AATTGCAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCT
TCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGGTTAAGTCCC
GCAACGAGCGCAACCCCTTGATCTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAA
ACCGGAAGAAAGGGGGGGGATGACGTCCAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGGGGTAAACACCGGG
TTCAAATGGAAGGGGGGACAAAAAAT

Secuencia 34. Cepa MVIC-09 (*Bacillus* sp)

>U_27F

TATACATGCAGTCGAGCGAATGGATTGAGAGCTTGCTCTCAAGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACAC
GTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAATATTTTGAAC
GCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCGCGTGCATTAGCTAGTTGG
TGAGGTAACGGCTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGA
GACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGC
AACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGA
ATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
GTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGA
AAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAGTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAAT
TCCATTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTA
ACTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACG
ATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGG
AGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTA
ATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGAAAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTT
CGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTG

Secuencia 35. Cepa QIVE-08 (*Enterobacter cloacae*)

>X1_27F

ACGGTAGCACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCT
GATGGAGGGGGATAACTACTGGAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTGCGAAGACCAAGAGGGGGACC
TTCGGGCCCTCTTGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGC
GACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGG
GAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAG
CCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAACCGCAGCAATTGACGTTAC
CCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGG
AATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGG
AAGTGCATTGCAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGAGAGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGC
GTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCCGAAAG
CGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTTGGGAGGTTGTG
CCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAA
AACTCAAATGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAA
CCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTTTCAGAGATGCTTTGGTGCCCTCGGGAAGTCTGAGACAGGTG
CTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTTGTGAAATGTTG

Secuencia 36. Cepa QIE-11 (*Serratia* sp)

>X2_27F

GGGAGCTTGCTCCCTGGGTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGG
GGGATAACTACTGGAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTGCGAAGACCAAGAGGGGGACCTTCGGGCC
TCTTGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCC
TAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA
GTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGT
TGTAAGCACTTTAGCGAGGAGGAAGGTGGTGAGCTTAATACGCTCATCAATTGACGTTACTCGCAGAAG
AAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGG
GCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATT
GAAACTGGCAAGCTAGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCT
GGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAG

CAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTGCGATTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCG
TGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAAT
TGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCT
TGACATCCAGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACCTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGT
CGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTTGTGCCAGC
GGTTCGGCCGGGAACCTCAAAGGAAACTGCCAGTT

Secuencia 37. Cepa QIE-08 (*Serratia marcescens*)

>X3_27F

GTCGAGCGGTAGCACAGGGGAGCTTGCTCCCTGGGTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGA
AACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAG
GGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAATGGCTCA
CCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACT
CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTG
AAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGAGGAGGAAGGTGGTGAGCTTAATACGCTCATCAATTG
ACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGT
TAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTCAA
CCTGGGAAGTGCATTTGAACTGGCAAGCTAGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGT
GAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGT
GCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTGCGATTTGGAGG
TTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGG
TAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGA
AGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACCTCTGAGACA
GGTGTGTCATGGCTGTGTCAGCTCGTGTGTTGTAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTT
ATCCTTTGTTGCCAGCGGTTCCGGCGGGAACCTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAAGGGTG
GGGATGACGTCAAGT

Secuencia 38. Cepa QVE-06 (*Psychrobacter alimentarius*)

>X4_27F

CATTTCTAGCTTGCTAGAAGATGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATACTTAGGAATCTACCTAGTAGTGG
GGGATAGCTCGGGGAAACTCGAATTAATACCGCATACGACCTACGGGAGAAAGGGGGCAACTTGTTGCTCT
CGCTATTAGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGATGGTGGGGTAAAGGCCTACCATGGCGACGATCTGTAG
CTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACCGGAGTATGAGACACGGCCCGGACTCCTACGGGAGGCGACAGT
GGGGAATATTGGACAATGGGGGAAACCCTGATCCAGCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTTTGGTTGT
AAAGCACTTTAAGCAGTGAAGAAGACTCTTCGGTTAATACCCGAGACGATGACATTAGCTGCAGAATAAGC
ACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTA
AAGCGAGCGTAGGTGGCTTGATAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCTGGGAAGTGCATCTGATAC
TGTCAGGCTAGAGTAGGTGAGAGGAAGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAG
GAATACCGATGGCGAAGGCAGCCTTCTGGCATCACTGACACTGAGGCTCGAAAGCGTGGGTAGCAAACA
GGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTACTAGTCGTTGGGTCCCTTGAGGACTTAGTG
ACGCAGCTAACGCAATAAGTAGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGG
GGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGCTCTTGACAT
ATCTAGAATCCTGCAGAGATGCGGGAGTGCCCTTCGGGAATTAGAATACAGGTGCTGCATGGCTGTGTCAG
CTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCGGGTTAA
GCCGGGAACCTCTAAGGATACTGCCAGTGACAACTGGG

Secuencia 39. Cepa QVB-02 (*Planococcus maritimus*)

>X5_27F

TTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCCTGCAGATCGGGATAACTCCGGGAAACCGG
TGCTAATACCGAATAGTTTTCGGCCTCTCATGAGGCTGCACGGAAAGACGGTTTCGGCTGTCACTGCAGGA
TGGGCCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGTAAACGGCCCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTG
AGAGGTTGATGGCCACACTGGGACTGAGACACGCCAGCTCCTACGGGAGGCGACGATAGGGAATCT
TCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAACTCTG
TTGTGAGGGAAGAACAAGTACCAGCTAACTACTGGTACCTTGACGGTACCTCACCAGAAAGCCACGGCTAA
CTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGC
GCAGGCGGTCTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGGA
CTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCA
GTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAG
ATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAG
CTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC

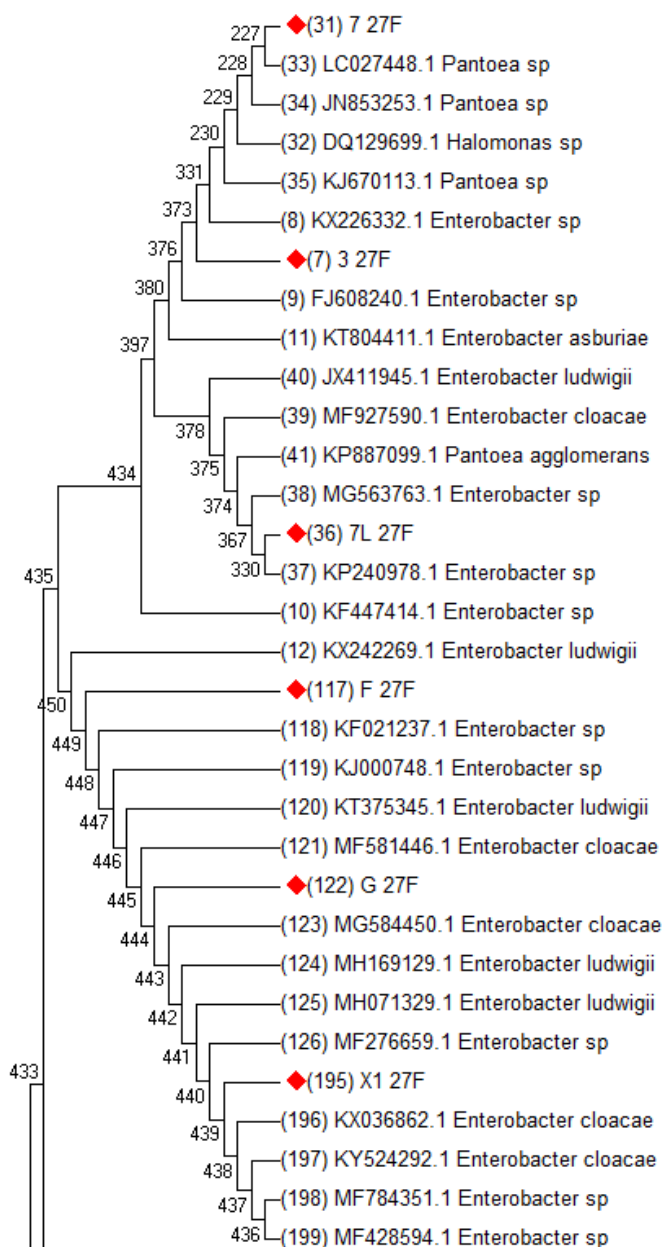
CGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCGC
TGCCCGCCTTGGAGACAAGGCTTTCCCTTCGGGGACAGCGGTGACAGGTGGTGATGGTTGTCGTCAGCT
CGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTG
GGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAAAGTGGGGATGACGTCAAATCA

Secuencia 40. Cepa MVB-02 (*Aeromonas hydrophila*)

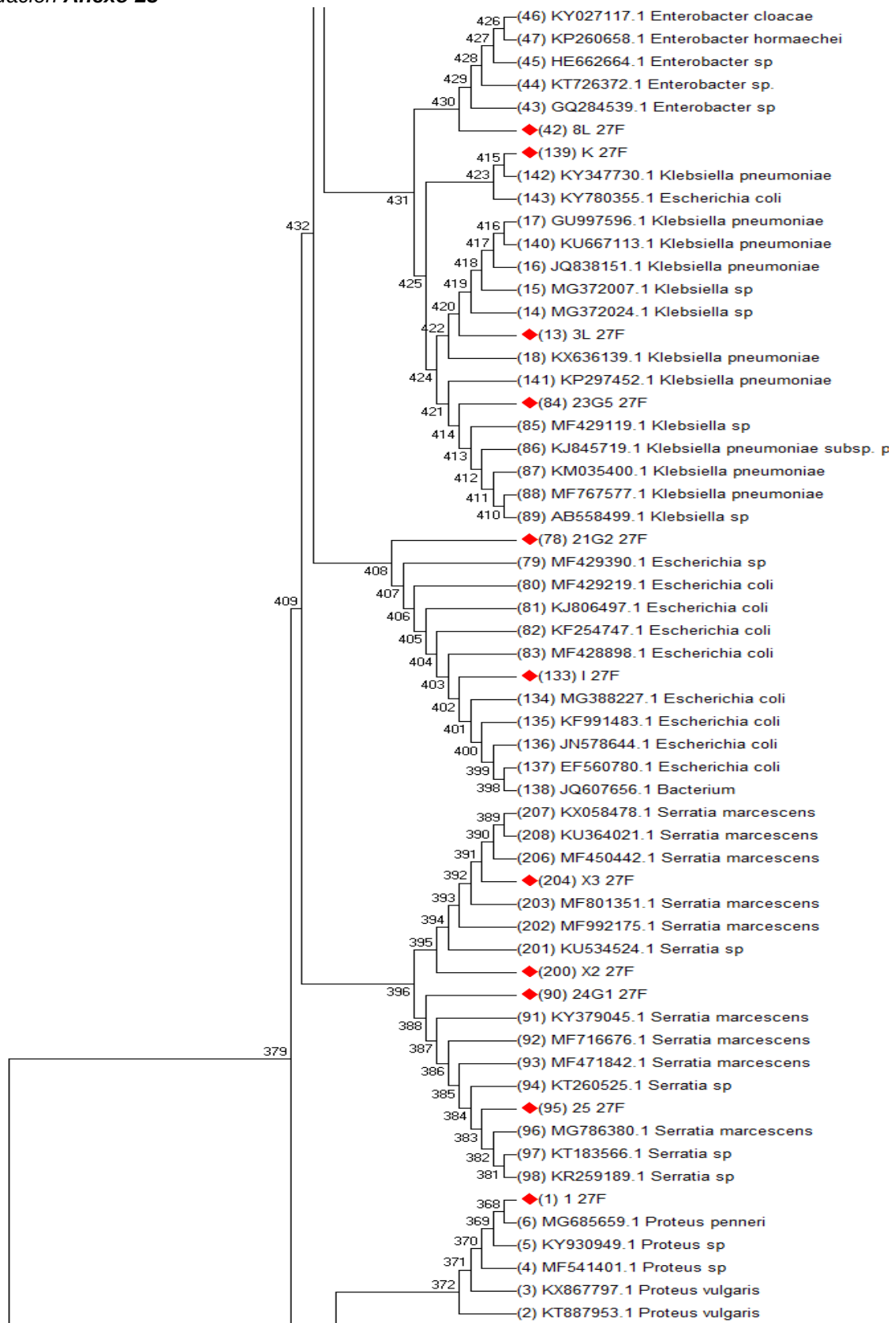
>X6_27F

GTGAGCGGCAGCGGGAAAGTAGCTTGCTACTTTTGCCGGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTGG
GAAATTGCCAGTCGAGGGGGATAACAGTTGGAACGACTGCTAATACCGCATACGCCCTACGGGGGAAA
GCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCGATTGGATATGCCAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGC
TCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAAGACAGGTCCAG
ACTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGT
GTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGAGGAGGAAAGGTTGATGCCTAATACGTATCAACT
GTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAG
CGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTGGATAAGTTAGATGTGAAAGCCCCGGGCT
CAACCTGGGAATTGCATTTAACTGTCCAGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCG
GTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTTGACAAAGACTGACGCTCAG
GTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGATTTGGA
GGCTGTGTCCTTGAGACGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAA
GGTTAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGC
GAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGTCTGGAATCCTGCAGAGATGCGGGAGTGCCTTCGGGAATCAGAAC
ACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC
CCTGTCCTTTGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGGAAGTCAAGGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAA
GGGTGGGGATGACGTTCAAGTCATCATGGGCCCTTACGGCCAGGG

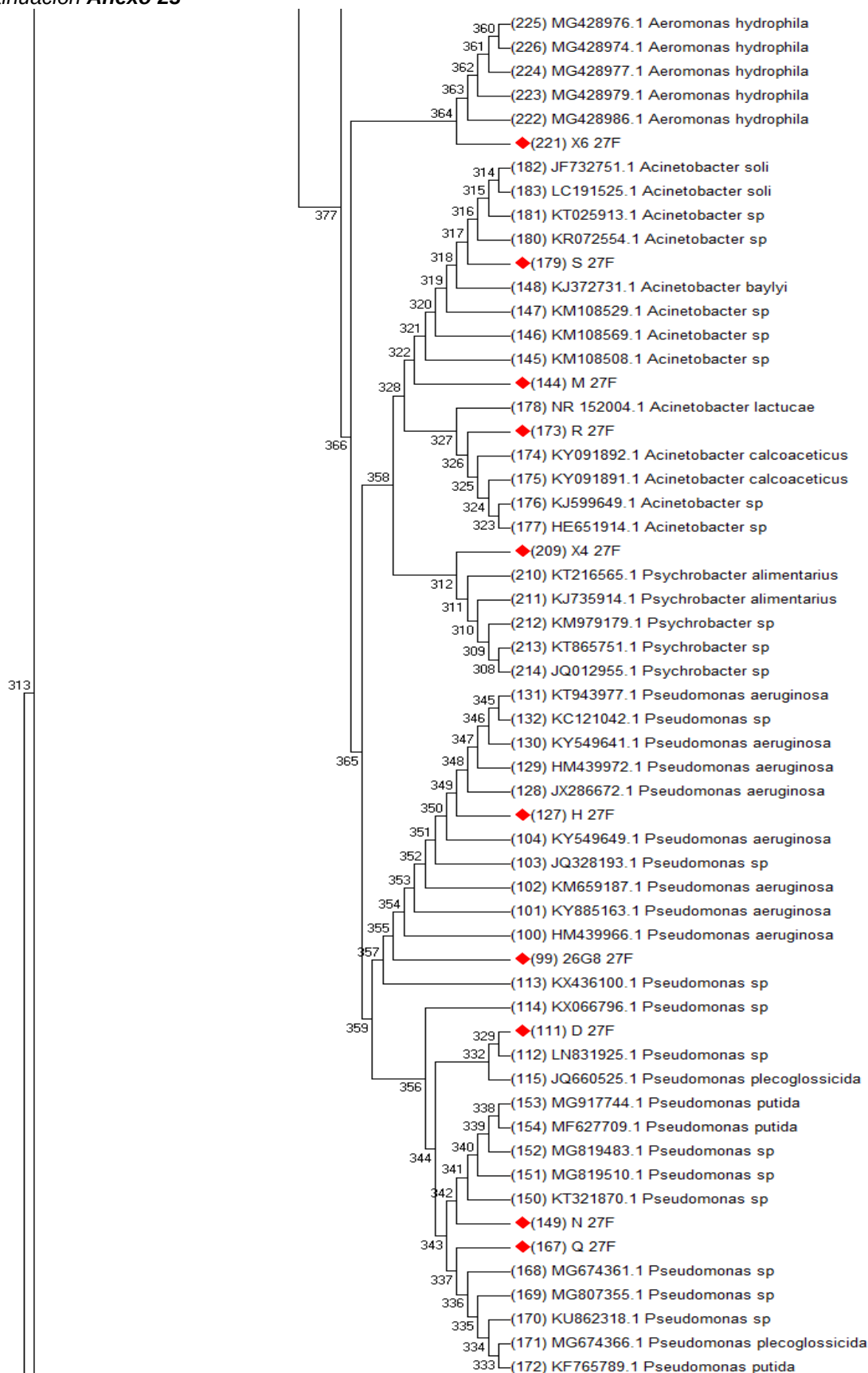
Anexo 23. Se muestra el árbol filogenético de bacterias usando el método del vecino más cercano. El árbol óptimo con la suma de la longitud de rama = 4.18061440. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de probabilidad máxima compuesta y están en las unidades del número de sustituciones de bases por sitio. El análisis involucró 226 secuencias de nucleótidos. Se eliminaron todas las posiciones que contienen huecos y datos faltantes. Hubo un total de 363 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA7. El código de acceso al GenBank se especifica al inicio del nombre del microorganismo y las secuencias en estudios se marcan con una viñeta de color rojo (Fuente propia).



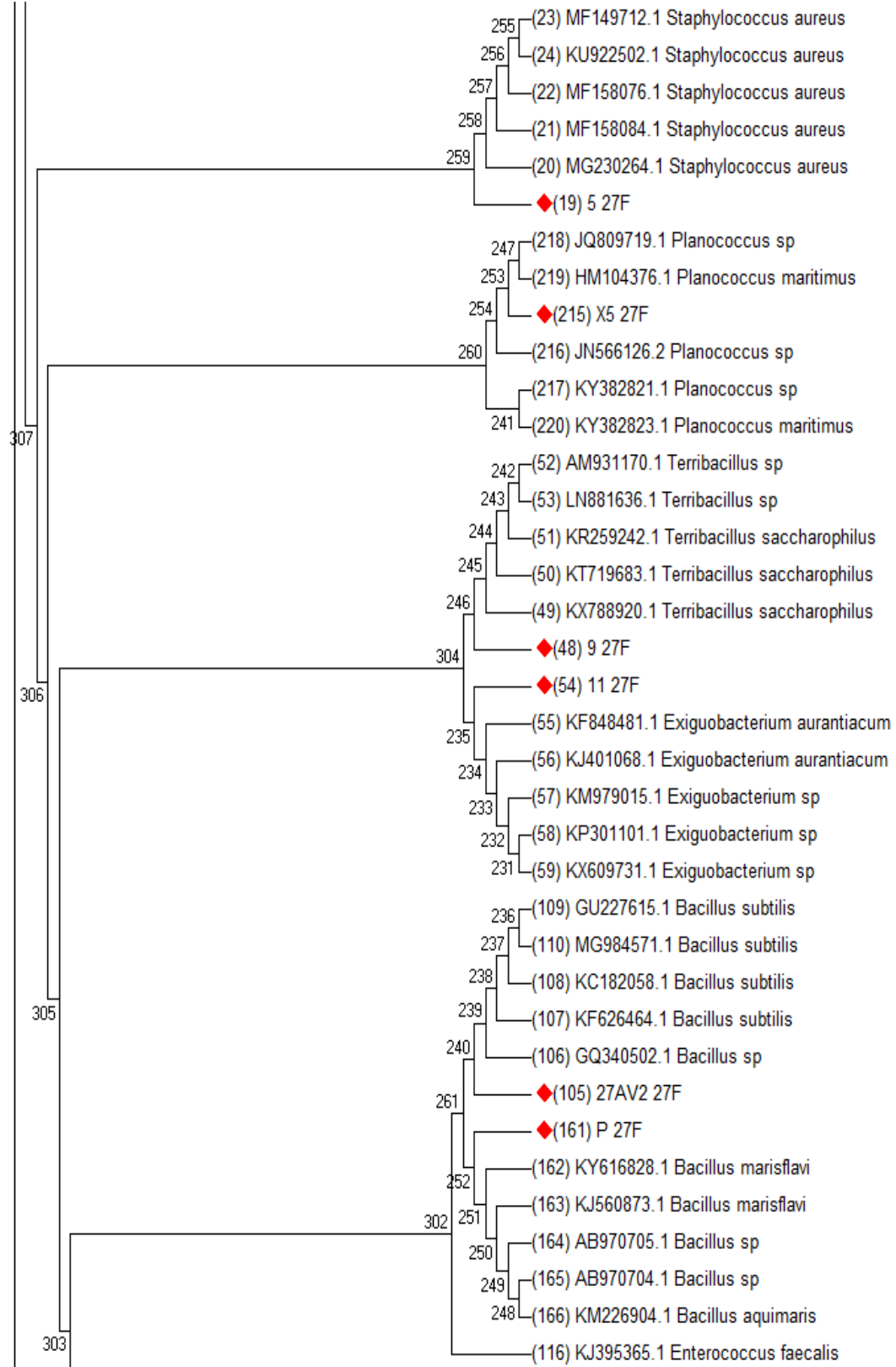
Continuación Anexo 23



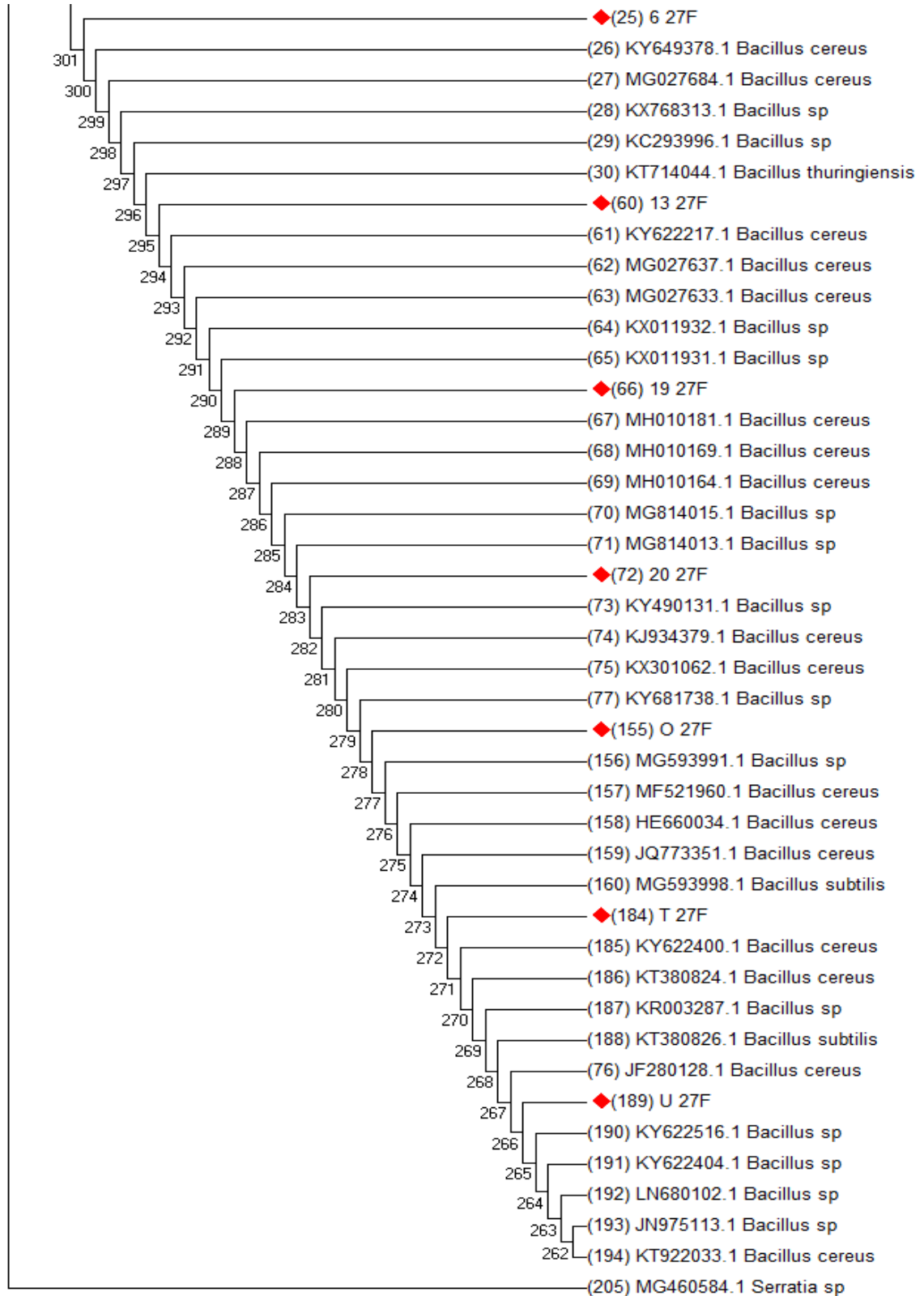
Continuación Anexo 23



Continuación Anexo 23



Continuación Anexo 23



Anexo 24. Secuencias corregidas y alineadas de los hongos identificados por vía molecular en formato FASTA

Secuencia 1. Cepa QID-09 (*Rhodotorula mucilaginosa*)

>Y7_LR0R

```
AGCGGCGAGCGAAGCGGGAAGAGCTCAAATTTATAATCTGGCACCTTCGGTGTCCGAGTTGTAATCTCTAG
AAATGTTTTCCGCGTTGGACCGCACACAAGTCTGTTGGAATACAGCGGCATAGTGGTGAGACCCCGTATA
TGGTGCGGACGCCAGCGCTTTGTGATACATTTTCAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAATTG
GGTGTAATTTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAAGAT
GAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTTAACAGTACGTGAAATTTGTTGGAAGGGAAACGCTTGAAGTCAGACTTGC
TTGCCGAGCAATCGGTTTGCAGGCCAGCATCAGTTTCCGGGATGGATAATGGTAGAGAGAAGGTAGCAGT
TTCGGCTGTGTTATAGCTCTCTGCTGGATACATCTTGGGGGACTGAGGAACGCAGTGTGCCTTTGGCGGGG
GTTTCGACCTCTTCACACTTAGGATGCTGGTGGAATGGCTTTAAACGACCCGCTTTGAAACACGGACCAAG
GAGTCTAACATGCTTGCAGATATTTGGGTGTCAAACCCGGATGCGTAATGAAAGTGAATGGAGGTGGGAAC
CGCAAGGTGCACCATCGACCGATCTGGATTTTAAATGATGGATTTGAGTAAGAGCACGTATGTTGGGACCC
GAAAGATGGTGAACATGCTGAATAGGGCGAAGCCAGAGGAAACTCTGGTGGAGGCTCGTAGCGGTTCT
GACGTGCAAATCGATCGTCAAATTTGGGTATAGGGGCGAAAGACTAATCGAACCATCTAGTAGCTGGTTCC
GCCGAAGTTTCCCTCAGGATAGCAGAAACTCACATCAGTTCTATGAGGTAAAGCGAATGATTAGAGGCCTTG
GGGTTGAAACAACCTTAACCTATTCTCAAACCTTAAATATGTAGGAAGTCCTTGCTACTTAATTGAGCGAGGA
CATGCGAATGAAAGTTTCTAGTGGGCCATTTTTGGTAAGCAGAACTGGCGATGCGGGATGAACCGAACGCG
AGGTTAAGGTGCCGGAATACACGCTCA
```

Secuencia 2. Cepa QID-15 (*Cybelindnera jadinii*)

>Y8_LR0R

```
TTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGAGGCTCTCAGCCCCCGAGTTG
TAATTTGAAGATGGTGTCTGGTGCCGGCCCCCTGTCTACGTTCCCTTGAACAGGACATCACAGAGGGTGA
GAATCCCGTCTGGCGGGGCGGCCTGGCTCCGTGTAGAGCGCCATCGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGC
AGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTG
ATGGAAGATGAAAAGAATTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTTGTTGAAAGGGAAGGGTATTGG
ATCAGACTTGGTGCTGTGCGAATAGCGGCTCTTCTTGGGCTGCCACTCGCACTCCACCGGGCCAGCATC
GGTTTGGCGGGCAAGACAATGGCGGGGAGACCTTCTTGGGCTGCGCTCTCGGGCAGTGTGTTTATAGCCCCGCT
GATGTTGCCTGCCTAGACCGAGGACTGCGGCTTCTGCCTAGGATGCTGGCGTAATGATCCAACACCGCCC
GTCTTGAAACATGGACCAAGGAGTCTAACGTCTATGCGAGTGTGTTGGGTGTAAACCCGTACGCGTAATGAA
AGTGAACGTAGGTGAGGGCCCTTTCTGGGTGCATCATCGACCGATCCTGATGTCTTCGGATGGATTTGAGT
AAGAGCATAGCTGTTGGGACCCGAAAGATGGTGAACATGCTGAATAGGGTGAAGCCAGAGGAAACTCTG
GTGGAGGCTCGTAGCGGTTCTGACGTGCAAATCGATCGTGAATTTGGGTATAGGGGCGAAAGACTAATCG
AACCATCTAGTAGCTGGTTCCTGCCGAAGTTTCCCTCAGGATAGCAGAAGCTCGTATCAGTTTTATGAGGTA
AAGCGAATGATTAGAGTCTTGGGGTCAAAACGACCTTAACTATTCTCAAACCTTAAATATGTAAGAAGTCC
TTGTTACTTAATTGAACGTGGACATTTGAATGAAGAGCTTTTAGGGGGCCATTTTTGGTAAGCCAGAAGTGG
CGATGCCGGGATGAAACCGAACGTAAAAGTTAAGGTGGCCAGAATACACGCCTCATCAGACACCACCAAAA
AGGTGTTAGTTCATTCTAGACAGCCCGGGACGGTGGCCATGGAAGAGTTCGGAACCCGCTAAGGAGTGT
G
```

Secuencia 3. Cepa QID-16 (*Candida pararugosa*)

>Y9_LR0R

```
AGTAACGGCGAGTGAACCGGGAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGCCAACAGGCCGAGTTGTAATTTGTAGAT
GGCTACACTGCATAATAGTAGATGCTCAAGTTCTTTGAAAAAGACATCATGGAGGGTGACAATCCCGTGAG
GCATGTTACTAGGAGCATATAGTGGGCTTTCTAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAAGTGCCTG
GTGAATACCATGTAAAGCTAAATATGGACGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACTGTGAAGGAAAGATGAAAA
GCACTCCGAAAGGAGAGTGAAATAGTACGTGAAATTTGTTAAAGTGAAGGGCTTGAGATCAGAATTGGTAG
TTTGGGTTCCACGTCCTCTTGGGGGCGTGTACTCCCTTTCCACCGGGCCAGCGGGAGTTTCGTCTCTTGGG
TAAAGCAGTGGAATGTAGCAGCTTGTCTGTATTATAGCCTCTGTTCATACAAGACGTCGAGACTTGTGTTTG
TTGGCGTAATGATCTCTAGCCACCCGCTTTGAAACACGGACCAAGGAGTCTATTGCCTATGCGAGTGTGTTGG
GTGGAACCCCTTGCGCGTAATGAAAGTGAAAGATCAGGGCTCTTTTTTGAAGTGCACGATCGACCGATCTT
GACGATTTTCAGATGGATTTGAGTAAGAGCATAGTTGATGGGACCCGAAAGATGGTGAACATACTTGGCGGA
GGCGAAGCCAGAGGAAACTCTGGTGGAGGTCCGTAGGGGTTCTGACGTGCAAACTGATCCTCTCAGCTG
AGTATGGGGGCGAAGACTAATCGAACCATCTAGTAGCTGGTTCCCTCCGAAGTTTCCCTCAGGATAGCAG
GAGCTCGTATCAGTTTTATGAGGTAAAGAAATGATTAGAGGTATTGGGGGTTGAAACGACCTTGACCTATTC
TCAAACCTTTGAATGTGAAGAAGTCCTGTTACTTAATTGAACGTGGACACTTGAATGAAAAGCTCTTAG
```


Secuencia 4. Cepa MIID-11 (*Trichosporon asahii*)

>Y10_LR0R

GTAACGGCGAGTGAAGCGGGAAGAGCTCAAATTTGAAATCTGGCAGTCTTCGATTGTCCGAGTTGTAATCTA
TAGAGGCGTTTTCCGTGCCGGACCGTGCCAAGTCTCCTGGAAAGGAGTATCAAAGAGGGTGATAATCCCG
TACTTAACACGACCACCGGTGCTCTGTGATACGTCTTCTACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAAA
TGGGTGGTGAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAAG
ATGAAAAGCACTTTGGAAAGAGAGTTAAACAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAACGATTGAAGTCAGTCG
TGTTCTTTGGATTAGCCAGTTCTGCTGGTCTACTTCCTTGGAAACGGGTCAACATCAGTTTTGTCCGGTGGA
TAAAGGTAGTAGGAATGTGACTTCTCCGGAAGTGTTATAGCCTATTATCACATACACTGGGTGAGACTGAGG
ACTGCAGCTCGCCTTTATGGCCGGCCTTCGGGCACGTTTCGAGCTTAGGATGTTGACATAATGGCTTTAAAC
GACCCGCTTTGAAACACGGACCAAGGAGTCTAACATATCTGCGAGTGTTTGGGTGTCAAACCTCGAGCGCGT
AATGAAAGTGAATTGGAGGGATCCGCAAGGAGCACCTTCGACCGATCCAGATGTTTACTGAAGGATTTGAG
TAAGAGCATATATGCTGGGACCCGAAAGATGGTGAACATGCTGAATAGGGCGAAGCCAGGGGAAACTCT
GGTGGAGGCTCGTAGCGATTCTGACGTGCAAATCGATCGTCAAATTTGGGTATAGGGGCGAAAGACTAATC
GAACCATCTAGTAGCTGGTTCCTGCCGAAGTTTCCCTCAGGATAGCAGAAACTCGCATCAGTTTTATGAGGT
AAAGCGAATGATTAGAGGCCTTGGGGACGAAACGTCCTTAACCTATTCTCAAACCTTAAATATGTAAGAAGC
ACTTGTTACTTAATTGAACGTGTGCATGCGAATGAAAGTTTCTAGTGGGCCATTTTTGGTAAGCAGAACTGG
GCGATGCGGGATGAACCGATCGTGGAG

Secuencia 5. Cepa MIVD-09 (*Cybelindnera jadinii*)

>Y12_LR0R

CAACAGGGATTGCCCCCTTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGCTTTTCG
GCCCCCGAGTTGTAATTTGTAGATAGTGTTTTGGCGTGGGCCCCCTGTCTACGTTCTTGGAAACAGGACGT
CACAGAGGGTGAGAATCCCGTCTGGCGGGGCGGCCTGGCTCCTTGTAACCGCCTTCGACGAGTCGAGTT
GTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGA
ACAAGTACAGTGATGGAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAACTACGTGAAATTGTGGAAAGG
GAAAGGTAATGGATCTCACTTGGGGCCTTGGGATTGCGCTCCCTTCGCGGGTCGCTTCTCGGGCTCGACT
GGGCCAGCATCTTGTGGGCGGATAGACGGTGGCGGAGTAACACGTCACTGCTATCGTGCTGGGCGTTTA
TACCCCCCGCTGATGTAGCCTGCCTACCAACTACTGCTTCTTCTGCCTATGATGCAGGGTTCATGATCCA
ACAGGCCCATCTTGGCACTTGGACGACCGAGTCTAACGCCGATACAAGTGTGTCTAATGTATAATGCGAAC
GCATGGTGAAAGTACAACGGAAGCGTAAGGCCATTTCTGTTGTACATCATCCGACATGGTTCTGATGTCCTT
CCGATCCAATATGTAATGAACAGAATCTGCTTAAGGACCCCGAAAATATGGGGGACCTATGGCCTGAA
GTGCGGGTGAAGCCCCGAGGAGTACTGCTTGGGGAGGGATCCCTATCGGTGTGATGACTCTGCAACA
ACGACTCGAACGAAATATTTGCGTATCAGGCGTACGTATAGGACTATG

Secuencia 6. Cepa MID-08 (*Pichia jadinii*)

>Y13_LR0R

CCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGAGGCTCTCAGCCCCCGAGTTGTAA
TTTGAAGATGGTGTCTGTTGTCGGGCCCCCTGTCTACGTTCTTGGAAACAGGACATCACAGAGGGTGAGAA
TCCCGTCTGGCGGGGCGGCCTGGCTCCGTGTAGAGCGCCATCGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGC
TCTAAGTGGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATG
GAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGTATTGGATC
AGACTTGGTGCTGTGCGAATAGCGGCTTCTTGGGCTGCCACTCGCACTCCACCGGGCCAGCATCGGT
TTGGGCGGCAAGACAATGGCGGGGGAACGTGGCACTGCTCTCGGGCAGTGTGTTTATAGCCCCCGCTGAT
GTTGCCTGCCTAGACCGAGGACTGCGGCTTCTGCCTAGGATGCTGGCGTAATGATCCAACACCGCCCGTCT
TGAAACATGGACCAAGGAGTCTAACGTCTATGCGAGTGTTTGGGTGTAACCCGTACGCGTAATGAAAGT
GAACGTAGGTGAGGGCCCTTTCTGGGTGCATCATCGACCGATCCTGATGTCTTCGGATGGATTTGAGTAAG
AGCATAGCTGTTGGGACCCGAAAGATGGTGAACATGCTGAATAGGGTGAAGCCAGAGGAACTCTGGTG
GAGGCTCGTAGCGGTTCTGACGTGCAATTCGATCGTCAATTTGGGTATAGGGGCGAAAGACTAATCGAAC
CATCTAGTAGCTGGTTCCTGCCGAAGTTTCCCTCAGGATAGCAGAAGCTCGTATCAGTTTTATGAGGTAAAG
CGAATGATTAGAGTCTTGGGGTGAACGACCTTAACCTATTCTCAAACCTTAAATATGTAAGAAGTCCTTG
TTACTTAATTGAACGTGGACATTTG

Secuencia 7. Cepa MVID-11 (*Penicillium janthinellum*)

>Z14 ITS1

TGTTTATCATACCTAGTTGCTTCGGCGGGCCCCGCCGTCAAGAAACGCCCGGGGGCATCTGCCCCCGGGC
GCACGCTTATGGCCGCCGGGGGGCATCCGCCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGCCCCCTGAACGCT
GTCTGAAGATTGCTGTCTGAGCGATTAGCTAAATCAGTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGC
ATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGA
ACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCACGG
CTTGTGTGTTGGGCCCCCGCCCCCGGCTCCCGGGGGGGCGGGCCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGT
CCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTCGTACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCCCGCCGGCGACCCCC
CCTCAATCTTTCTCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGC

Secuencia 8. Cepa MVID-03 (*Penicillium simplicissimum*)

>Z15 ITS1

GTGTTTATCGTACCTTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCTCACGGCCGCCGGGGGGCATCCGCTCCCGGGCC
CGCGCCCGCCGAAGACACCAATGAATCTGTCTGAAGATTGCAGTCTGAGCAGATTAGCTAAATCAGTTAA
ACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATT
GCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGT
CCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCTCCGCCCCCGGCTCCCGGGGGGCGG
GCCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTCGTACCCGCTCTGTAGG
CCCGGCCGGCGCCCGCGGCGACCCCAATCAATCTATCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCG
CTGAACCTAAGCATATCA

Secuencia 9. Cepa QIVD-12 (*Trichoderma sp*)

>Z16 ITS1

ACTCCAAACTTTTTTCTCTCCGTCGCGGCTCCCGTCGCGGCTCTGTTTTATTTTGGCTCTGAGCCTTTCTC
GGCGACCCTAGCGGGCGTCTCGAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGAT
GAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAC
ATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTCAACCCTCGAACCCTCCGGGG
GGTCGGCGTTGGGGGATCGGCCCTCACCGGGCGCCCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCT
CTCATGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCACCGGGAGCGCGGCGCGGCCACAGCCGTAAACACCCCCAAATT
TTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGGCGGAGAAAAAC
TAAACTACAGTCAAGGGCGGAGGGGGTAGAATGCCTAGCTGTATCCTT

Secuencia 10. Cepa QID-17 (*Aspergillus hirsutiae*)

>Z17 ITS1

GTGTTCTATTGTACCTTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCGTTTTTCGAACGGCCGCCGGGGAGGCCTCGCGCCC
CCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGACCCCAACATGAACGCTGTTCTGAAAGTATGCAGTCTGAGTTTGATTATC
ATAATCAGTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA
AGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGG
GGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCCCCCGTCCCCGGTTC
TCCCCGGGGACGGGCCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCA
CCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGCGCCAGCCGACACCCCAACTTTATTTTCTAAGGTTGACCTCGGATCAG
GTAGGGATACCCGCTGAACTTAAG

Anexo 25. Se muestra el árbol filogenético de hongos usando el método del vecino más cercano. El árbol óptimo con la suma de la longitud de rama = 2.70992492. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de probabilidad máxima compuesta y están en las unidades del número de sustituciones de bases por sitio. El análisis involucró 58 secuencias de nucleótidos. Se eliminaron todas las posiciones que contienen huecos y datos faltantes. Hubo un total de 359 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA7. El código de acceso al GenBank se especifica al inicio del nombre del microorganismo y las secuencias en estudios se marcan con una viñeta de color rojo (Fuente propia).

